THESE

présentée à

L'UNIVERSITE de PARIS VII

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

par

Pascal HOUSSET

SUJET DE LA THESE:

"ETUDE DU MECANISME DE TRANSPORT DES BASES PURIQUES CHEZ LA LEVURE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE : ROLE DES PHOSPHORYBOSYLTRANSFERASES"

Soutenue le 27 janvier 1976, devant la comission d'examen:

M.F. CHAPEVILLE	Président
M.J.C. PATTE	Rapporteur
M.H. HESLOT	Examinateur
M.J. SCHWENCKE	Examinateur

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE de PARIS VII

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

par

Pascal HOUSSET

SUJET DE LA THESE:

«ETUDE DU MECANISME DE TRANSPORT DES BASES PURIQUES CHEZ LA LEVURE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE : ROLE DES PHOSPHORYBOSYLTRANSFERASES»

Soutenue le 27 janvier 1976, devant la comission d'examen:

M.F. CHAPEVILLE	Président
M.J.C. PATTE	Rapporteur
M.H. HESLOT	Examinateur
M.J. SCHWENCKE	Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VII

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR INGENIEUR

par

Pascal HOUSSET

Sujet de la thèse :

" Etude du mécanisme du transport des bases puriques chez la levure Schizosaccharomyces pombe : Role des Phosphorybosyltransférases "

Soutenue le 27 janvier 1976, devant la Commission d'examen :

M. F. CHAPEVILLE	Président
M. J.C. PATTE	Rapporteur
M. H. HESLOT	Examinateur
M. J. SCHWENCKE	Examinateur

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur HESLOT qui a bien voulu m'acceuillir au sein du Laboratoire de Génétique de L'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, et suivre avec intérêt le développement de ces recherches.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur F. CHAPEVILLE de l'honneur qu'il me fait de présider cette thèse, et à Monsieur le Professeur J.C. PATTE de l'intérêt qu'il a porté à mon travail et de l'aide qu'il m'a prodiguée tout au long de sa réalisation.

Je suis heureux de dire ici combien il m'a été agréable et profitable de travailler avec le docteur J. SCHWENCKE sur le problème des protoplastes de S. Pombe. Je le remercie cordialement.

Que Madame Maria NAGY trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon admiration. Ses conseils ou ses critiques m'ont toujours soutenu et stimulé dans mon travail et même en-dehors du cadre du laboratoire. Je la remercie de tout ce temps qu'elle a consacré, avec indulgence, à ma formation scientifique.

Un grand merci enfin à tout le laboratoire, et notamment à Micheline LAMBERT avec qui j'ai toujours eu plaisir à collaborer.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548120_0012

P L A N

pages

INTRODUCTION 4

.Résumé bibliographique 6

. Position du problème 10

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES 11

A) Biologie de Schizosaccharomyces pombe "

B) Milieux deculture "

C) Conditions de stérilisation etde culture 13

D) Dosage des protéïnes "

E) Dosage standard des G-PRT et A-PRT 14

F) Electrophorèse sur gel d'acrylamide 15

G) Focalisation isoélectrique "

H) Mesure de l'activité PRPP synthétase 16

I) Détermination du pool intracellulaire de PRPP 17

J) Dosage de la Glucose-6-Phosphate deshydrogénase 18

K) Méthode d'obtention des protoplastes "

L) Mesure de"l'uptake" des bases puriques par les cellules entières "

M) Mesure de "l'uptake" des bases puriques par les protoplastes 19

N) Méthode d'obtention d'une fraction membranaire de S.Pombe 20

O) Origine des préparations commerciales. 21

CHAPITRE II : ETUDE DE "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS DE S. POMBE. 22

Introduction : Caractéristiques des mutants "pur 1","dap 1" "gup 1", "pur 1 dap 1".

1) Dépendance de "l'uptake" vis à vis de la teneur en ammonium du milieu. 26

2) Dépendance de "l'uptake" vis à vis du pH du mélange d'incubation. 33

pages

3) Dépendance de l'"uptake" de guanine et d'adénine vis à vis des inhibiteurs des pyrophosphorylases et vis à vis du PRPP. 33

CHAPITRE III : QUELQUES PROPRIETES DES PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES ET DE LA PRPP SYNTHETASE DE S. POMBE. 35

A) LES PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES :

1) Mise en évidence d'une hétérogénéité de l'APRT et de la G-PRT "

2) Focalisation isoélectrique, 38

3) Electrophorèse sur gel d'acrylamide 43

B) LA PRPP SYNTHETASE 44

1) Essai de conservation de la PRPP synthétase "

2) Besoin en ion magnésium 49

3) Activation par le phosphate inorganique "

4) Cinétiques "

5) Inhibition par les nucléotides. 51

CHAPITRE IV : VARIATIONS DES ACTIVITES SPECIFIQUES DES PHOSPHORIBOSYL-TRANSFERASES, DE LA 5' PHOSPHORIBOSYL-1-PYROPHOSPHATE ET DE LA VITESSE INITIALE D'ENTREE DES BASES PURIQUES PENDANT LA CROISSANCE DE S. POMBE. 52

A) LA SOUCHE SAUVAGE SUR MILIEU COMPLET ET MINIMUM

1)"Uptake" de guanine et d'adénine "

2) La PRPP synthétase 58

3) Les phosphoribosyltransférases. 64

B) LA SOUCHE MUTANTE "GUP 1" SUR MILIEU COMPLET. 68

CHAPITRE V : ETUDE DU POOL DE 5' PHOSPHORIBOSYL-1-PYROPHOSPHATE 71

1) Validité de la méthode de dosage "

2) Variation du pool de PRPP pendant la croissance de la levure, 73

3) Etude de "l'uptake" des bases puriques et du pool de PRPP chez les cellules cultivées en présence de"Formycine" . 76

CHAPITRE VI : ETUDE DU TRANSPORT CHEZ LES PROTOPLASTES DE S. POMBE. 80

1) L'obtention des protoplastes
2) Le transport de la guanine par les protoplastes en comparaison avec celui des cellules entières. 86

CHAPITRE VII : MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AU NIVEAU DES MEMBRANES DE S. POMBE. 89

CONCLUSION GENERALE 94

BIBLIOGRAPHIE 96

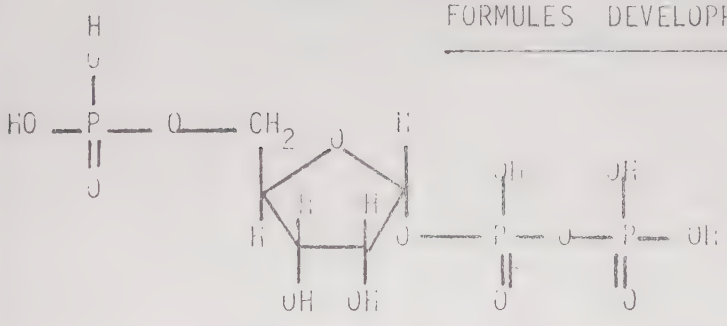
LISTE DES ABREVIATIONS

- A-PRT : Adénine phosphoribosyltransferase, enzyme responsable de la transformation de l'adénine en AMP,
- G-PRT : Guanine phosphoribosyltransferase, enzyme responsable de la transformation de la guanine en GMP, de l'hypoxanthine en IMP, et de la xanthine en XMP,
- IMP : Inosine 5' monophosphate
- GMP : Guanosine 5' monophosphate
- AMP : Adénosine 5' monophosphate
- XMP : xanthosine 5' monophosphate
- s AMP : Adenylosuccinate
- PRPP : 5' phosphoribosyl-1-pyrophosphate
- AIR : 5-aminoimidazole ribotide
- AICAR : 5-amino-4-carboxamide-imidazole ribotide
- PP : pyrophosphate inorganique
- G : Guanine
- Hx : Hypoxanthine
- A : Adénine
- X : Xanthine
- UMP : Uridine 5' monophosphate
- CMP : Cytidine 5' monophosphate
- OMP : Orotidine 5' monophosphate
- O-PRT : Orotate phosphoribosyltransferase
- O : Acide orotique
- FPMS : Fluroïde de phénylméthane sulfonyl
- EDTA : Acide ethylène diaminetetracétique
- DTT : Dithiothreitrol

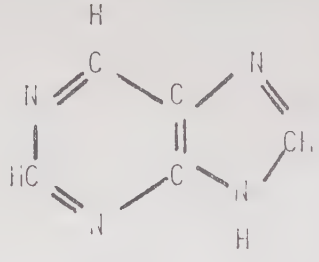
NOMENCLATURE ENZYMATIQUE

- PRPP amidotransferase	EC 2.4.2.14.
- PRPP synthetase	EC 2.7.6.1.
- Glucose 6 Phosphate deshydrogénase	EC 1.1.1.49.
- Orotate phosphoribosyltransferase	EC 2.4.2.10.
- Guanine phosphoribosyltransferase	EC 2.4.2.8.
- Adénine phosphoribosyltransferase	EC 2.4.2.7.

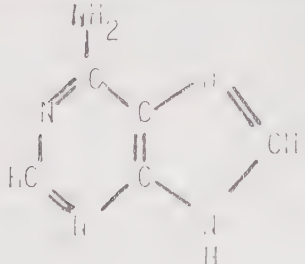
FORMULES DEVELOPPEES



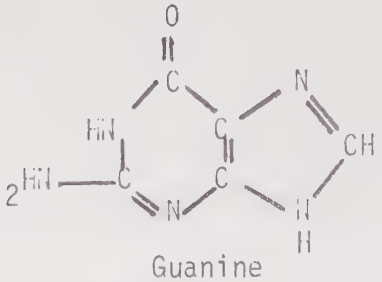
5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate



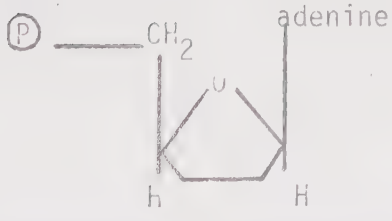
Purine



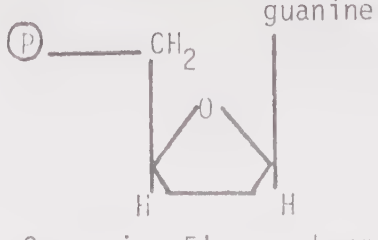
Adénine



Guanine



Adénosine 5' monophosphate



Guanosine 5' monophosphate

REMARQUE IMPORTANTE

Tout au long dece travail, nous utiliserons le mot "uptake" n'ayant pu trouver de terme générique français qui lui corresponde suffisamment bien. La signification de ce mot anglais sera pour nous la vitesse initiale linéaire de pénétration, mesurée pendant une minute à 30°C.

INTRODUCTION

Les mécanismes de régulation de la cellule peuvent se situer à plusieurs niveaux. Entre autres :

- Induction ou répression de la synthèse de l'enzyme au niveau du gène pour les ajustements les plus importants,
- Rétroinhibition de l'activité enzymatique pour les ajustements précis et instantanés,

Ces types de régulation, simples pour des voies biosynthétiques non branchées, deviennent extrêmement complexes pour des voies ramifiées.

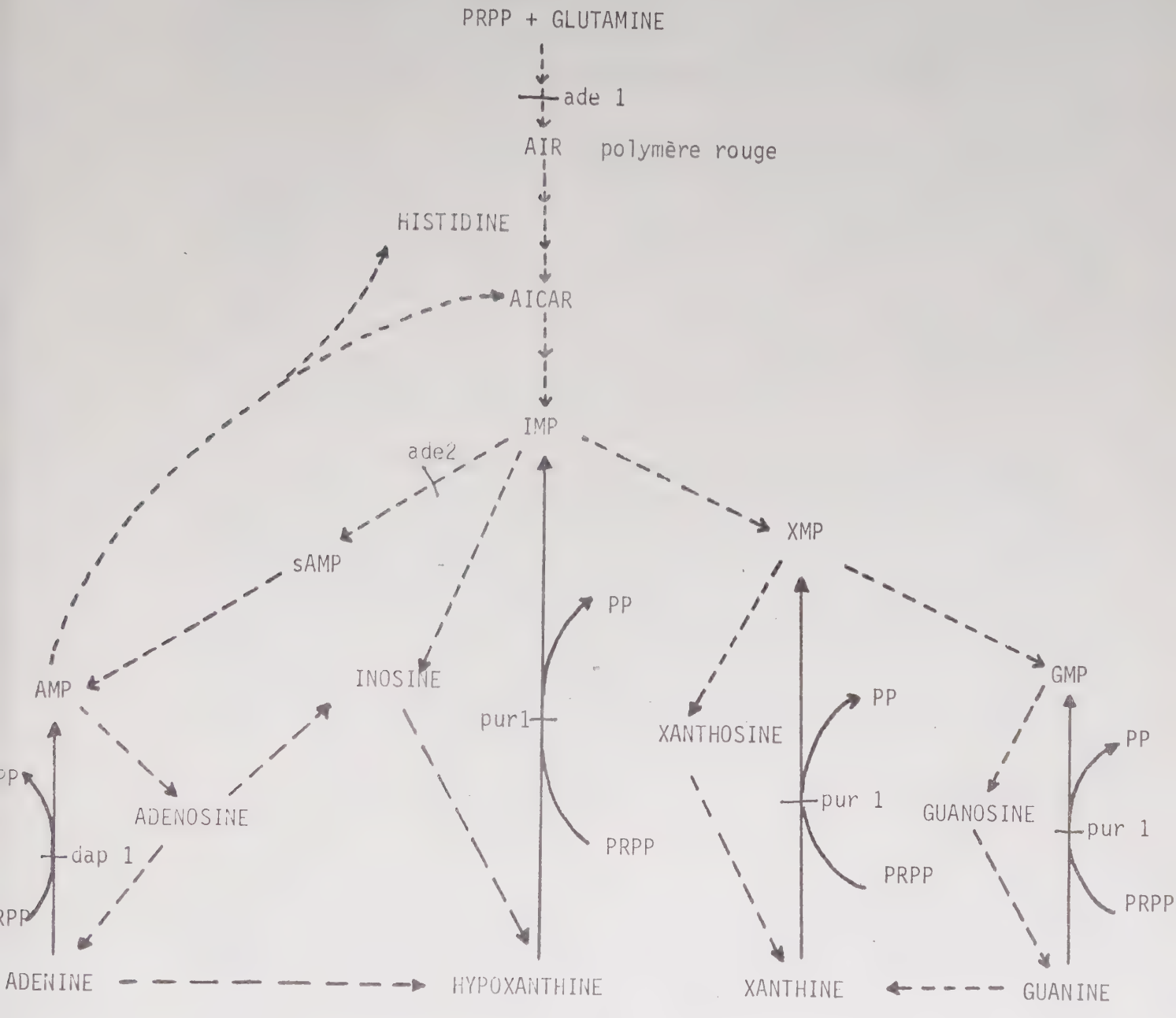
Au niveau de la levure S. Pombe, le contrôle de l'utilisation des purines présente la particularité de dépendre de l'interaction de deux voies métaboliques qui convergent toutes deux vers la formation de nucléotides :

- La voie de biosynthèse "de novo" qui conduit à la synthèse des nucléotides puriques par une succession de réactions enzymatiques à partir de précurseurs endogènes simples (1).

- La voie de "réutilisation" ou "salvage pathway", par laquelle les bases puriques libres d'origine exogène ou catabolique sont transformées en nucléosides monophosphates par l'apport du radical phosphoribosyl, issu du 5' phosphoribosyl-1-pyrophosphate, grâce aux phosphoribosyl-transferases (2).

Ces deux voies peuvent être schématisées de la façon ci-après :

SCHEMA D'INTERCONVERSION DES DERIVES PURIQUES CHEZ S. POMBE D'APRES J. POURQUIE et H. HESLOT.(3)



En minuscule : Nom des mutants affectés dans les différentes voies métaboliques.

——→ : Voie de"réutilisation"

- - - - → : Voie"de novo".

L'universalité de la voie "de novo" a été mise en évidence dès 1960 par Moat et Friedman (4), malgré quelques modifications de détail chez certains organismes (5). De même, la conversion des purines libres en leurs dérivés mononucléotidiques correspondants par l'intermédiaire des purines-phosphoribosyltransferases a été décrite chez la levure (6), les cellules de mammifères (7), et les bactéries (8,9,10).

Un sévère contrôle métabolique régit les interconversions existant entre les nucléosides monophosphates issus de ces deux voies de biosynthèse. D'autre part, par l'action de phosphotransférases, les mononucléotides peuvent donner naissance à leurs dinucléotides et trinucléotides correspondants (11,12). Nous sommes donc en présence d'un système complexe où ces composés, ayant en commun un radical phosphoribosyl, sont susceptibles d'agir sur les voies "de novo" et de "réutilisation" (par rétroinhibition par exemple).(13, 14, 15).

Nombre d'auteurs, tel que Nyhan, considèrent qu'un facteur important de la régulation, commun aux deux voies, est le 5' phosphoribosyl-1-pyrophosphate (16, 17). Il est en effet substrat des phosphoribosyltransferases et du premier enzyme de la voie"de novo", la PRPP amidotransferase. Ce composé, riche en énergie, peut apparaître, de prime abord, comme la plaque tournante du métabolisme des purines.
Sa formation est assurée par une réaction exigeante en énergie donc sensible à l'état physiologique de la cellule (18):

$$R\text{-}5\text{-}P + ATP \xrightarrow{Mg^{++}} PRPP + AMP$$

Le jumelage du transport d'un composé exogène et de la modification chimique de ce composé par une réaction métabolique nécessitant de l'énergie, définit le phénomène de "translocation" (Kaback , 19).
Grâce à un unique apport d'énergie, ce mécanisme permet de réaliser deux opérations : passage de la membrane et modification structurale du composé exogène. Un tel couplage a déjà été décrit pour le transport des sucres chez les cellules bactériennes (Kundig, Simoni) où le système PEP-phosphotransferase (20, 21) fonctionne au niveau de la membrane pour catalyser la phosphorylation du glucose. (Kundig, Ghosh, Roseman) (22, 22bis).

Un certain nombre de travaux sur l'utilisation des purines pouvait déjà suggérer que les phosphoribosyltransferases étaient impliquées, elles-aussi, dans le mécanisme de la perméation des bases puriques chez les bactéries (23, 24, 25, 27), chez les levures (28) et chez les cellules de mammifères (29) :

- Plus précisément, Berlin, en 1966, montre que chez Bacillus Subtilis, d'une part "l'uptake" des différentes bases puriques par la bactérie est proportionnel à l'activité pyrophosphorylasique correspondante, et d'autre part, qu'une exposition des cellules à de l'adénine radioactive entraine un marquage plus important de L'AMP intracellulaire que de l'adénine intracellulaire (3o).

- Hoffmeyer en 1971, montre que chez Salmonella Typhimurium, l'adénosine et l'inosine d'origine externe ne sont pas directement phosphorylées mais doivent d'abord être dégradées en bases libres, qui réagissent dans un deuxième temps avec le PRPP pour être incorporées sous forme de nucléosides monophosphates. Ceci nous indique la nécessité de l'intervention des phosphoribosyltransférases dans l'incorporation des nucléosides aux dépens de l'action directe des nucléosides phosphorylases (31). Les mêmes résultats ont été obtenus chez E. Coli pour l'adénosine (32,33).

- Zimmermann et Magasanik, en 1964, isolent un mutant de Salmonella typhimurium, résistant à la 6-mercaptopurine. "L'uptake" des bases puriques apparait très affecté chez ce mutant ; par contre, il ne présente pas de modifications d'activité des phosphoribosyltransferases in vitro.
Ces auteurs suggèrent alors, que l'enzyme, actif dans les extraits in vitro, aurait despropriétés modifiées in vivo (34). En effet, Adye, en 1966, montre que la G-PRT purifiée, issue de ce mutant, n'a pas le même profil d'élution sur DEAE.cellulose que l'enzyme isolé à partir de la souche sauvage. (35).

- En 1971, Hochstadt-Ozer, montre clairement que chez E. Coli, l'accumulation d'adénine est facilitée par la présence d'une adénine phosphoribosyltransferase localisée au niveau de la membrane plasmique et que ces deux activités, perméasiques et pyrophosphorylasiques, sont rétroinhibées par les mêmes nucléotides et présentent les mêmes optima de pH (36).

TABLEAU I

LISTE DES MUTANTS DE S. POMBE AFFECTES DANS LE TRANSPORT

NOMINATION	RESISTANT A	COULEUR SUR YEA	CARACTERISTIQUES DES PRTs ET DU TRANSPOR DES BASES PURIQUES
972 h^-	Souche sauvage	blanc	Phénotype sauvage
pur 1	8-aza-2-thioxanthine	rouge	$G\text{-}PRT^{-*}$, Transport de la guanine et de l'hypoxanthine affecté. Excréteur d'Hx.
dap 1	2,6 diaminopurine	blanc	$A\text{-}PRT^{-**}$, Transport de l'adénine affecté
ur 1 dap 1		rouge	$A\text{-}PRT^-$ et $G\text{-}PRT^-$. Transport des 2 bases puriques affecté.
gup 1	8-aza guanine	blanc	PRTs actives in vitro. Transport de guanine et d'adénine affecté sur milieu riche en NH_4^+

TABLEAU Ibis

LISTE DES MUTANTS AUXOTROPHES BLOQUES DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE "DE NOVO"

DENOMINATION	BLOC METABOLIQUE
ade 1	PRA ⟶/⟶ GAR
ade 2	IMP ⟶/⟶ sAMP

* : $G\text{-}PRT^{-*}$: souche incapable de réaliser les transformations :

G ⟶ GMP

Hx ⟶ IMP

X ⟶ XMP

** : $A\text{-}PRT^{-**}$: souche incapable de réaliser la transformation :

A ⟶ AMP

- En 1972, le groupe de Uwe Reichert, à Berlin, travaillant sur la souche sauvage de Saccharomyces cerevisiae, montre que ces cellules, après exposition aux différentes bases puriques, accumulent fortement l'hypoxanthine et la guanine par rapport à leur concentration externe respective , mais n'accumulent pas l'adénine sous forme de base libre.

- En 1973, Bagnara et Finch montrent une étroite dépendance entre le pool intracellulaire de nucléotides accumulés par la cellule et le pool de PRPP, substrat des PRTs (37).

- Au niveau de notre laboratoire, l'investigation du problème du transport actif des bases puriques, avec l'intervention possible des phosphoribosyltransferases chez la levure S. Pombe , semblait intéressante par le fait que nous possédions des mutants affectés au niveau des deux PRTs et des mutants affectés dans l'accumulation des bases puriques (46) (Tableau I).

J. Pourquié, a montré qu'il existait chez S. Pombe un système de transport commun pour les bases adénine, guanine et hypoxanthine ; l'entrée de chaque base étant inhibée compétitivement par les deux autres, les valeurs des Km et des Ki étant identiques. L'entrée de la xanthine, par contre, semble relever d'un système différent du précédent (38).

Ces différents faits soulevaient entre autres questions, quant à l'élucidation du rôle des phosphoribosyltransferases dans "l'uptake" des bases puriques :

- Le mutant de perméation gup 1 (voir tableau I) présente-t-il des modifications par rapport à la souche sauvage au niveau des phosphoribosyltransferases ?

- La phosphoribosylpyrophosphate synthétase intervient-elle dans la régulation du transport soit directement soit par l'intermédiaire du pool de PRPP intracellulaire ?

- Peut-on mettre en évidence une liaison éventuelle entre les activités perméasiques et pyrophosphorylasiques pendant la croissance de la levure ?

- Existe-t-il plusieurs localisations distinctes des PRTs dans la cellule (par exemple, une localisation membranaire et une localisation cytoplasmique) et est-il possible de différencier ces deux formes enzymatiques ?

Dans le travail exposé ici, nous avons cerné le problème de l'intervention des PRTsdans"l'uptake" des bases puriques par les approches suivantes :

- L'étude de quelques propriétés physiques et biochimiques des PRTs : identification de formes enzymatiques différentes (séparation sur colonne, électrophorèse)

- La régulation de ces enzymes, c'est à dire la variation de leurs activités spécifiques au cours de la croissance chez la souche sauvage et les différents mutants.

- La relation entre l'activité enzymatique de la PRT, de la PRPP synthétase et de "l'uptake" proprement dit des bases puriques au cours de la croissance de S. Pombe.

- L'étude du pool de PRPP et de la PRPP synthétase et leurs variations au cours de la croissance de la levure.

- L'obtention de protoplastes de S. Pombe , l'étude de "l'uptake" des bases puriques chez ces protoplastes et la mise en évidence d'une localisation membranaire des PRTs.

Ces cinq points pourront constituer les grandes lignes de notre exposé.

MATERIELS ET METHODES

A. BIOLOGIE DE S. POMBE.

Cette levure se multiplie végétativement par simple division mitotique suivie d'une fission symétrique du cytoplasme et du noyau.

Après fusion de deux cellules sexuellement compatibles, le zygote subit une méïose qui donne quatre ascospores à disposition linéaire dans l'asque.

B. COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE.

1) Milieu complet à l'extrait de levure (YEA)

a) Milieu liquide

- Extrait de levure (Difco) ..... 5 g
- Glucose ..... 20 g
- KH_2PO_4 ..... 4,25 g
- K_2HPO_4 ..... 5,5 g
- Antimousse ..... 1 goutte
- Eau distillée ..... 1000 ml

b) Milieu solide

- Extrait de levure (Difco) ..... 5 g
- Glucose ..... 20 g
- Bactoagar (Difco) ..... 20 g
- Eau distillée ..... 1000 ml

2) Milieu minimum (MMA)

a) Solution A_1 d'oligoéléments

- H_3Bo_3 ..... 500 mg
- $CuSO_4$, 5 H_2O ..... 40 mg
- KI ..... 100 mg
- $FeCl_3$, 6 H_2O ..... 0,8 ml
- $MnSO_4$, 4 H_2O ..... 530 mg

- $H_2MoO_4, 2H_2O$ ..... 160 mg
- $Zn\ SO_4, 7\ H_2O$ ..... 400 mg
- eau distillée ..... 1000 ml

b) Solution A2 de sels

- KH_2PO_4 ..... 10 g
- $Mg\ SO_4, 7\ H_2O$ ..... 5 g
- NaCl ..... 1 g
- $CaCl_2, 6\ H_2O$ ..... 1,5 g
- $(NH_4)_2\ SO_4$ ..... 50 g
- sels A_1 ..... 10 ml
- eau distillée ..... 1000 ml

c) Solution 3A.

- Pantothénate ..... 100 mg
- Acide nicotinique ..... 1 g
- Meso-Inositol ..... 1 g
- Eau distillée ..... 1000 ml

d) Solution 3B

- Ethanol à 50 % ..... 100 ml
- Biotine ..... 1 mg

e) Milieu minimum

- Glucose ..... 10 g
- Solution 3A ..... 20 ml
- Solution 3B ..... 1 ml
- Solution A2 ..... 100 ml
- $Na_2\ HPO_4, 12\ H_2O$ ..... 4 g
- Eau distillée ..... 880 ml

Le milieu MMA ci-dessus sera défini comme milieu MMA N_{5000} riche en "ammonium". Le milieu MMA N_{100} "pauvre en ammonium" ne comportera que 100 mg de sulfate d'ammonium par litre.

Le milieu minimum solide est obtenu en ajoutant 20 g de bacto-agar par litre. Le milieu peut être tamponné soit par un mélange Tris 0,1 M, acide citrique 0,1 M, soit par un mélange phosphate disodique 0,2 M acide citrique 0,1 M.

3) Milieu de culture pour l'obtention des protoplastes.(YPG-T) d'après Svihla, Schlenk et Dainko (39).

- Extrait de levure Difco ..... 0,5 % (W/v)
- Peptone Difco ..... 0,5 % (w/v)
- Glucose ..... 3 % (w/v)
- L-méthionine ..... 5 mM
- DL homocystéïne thiolactone ..... 5 mM
- Chlorhydrate de DL méthionine-méthyl sulfonée 5 mM

C. CONDITIONS DE STERILISATION ET DE CULTURE.

Les cultures et précultures liquides sont faites en erlenmeyer sur agitateur rotatif thermostaté à 30°C. Le rapport liquide-volume de l'erlenmeyer ne dépassait jamais 2/3 afin d'assurer une bonne aération pendant l'agitation. Les cellules de la souche sauvage ou des mutants, sont précultivées 24 Heures sur milieu solide, puis 48 Heures sur milieu liquide afin de n'ensemencer dans la mesure du possible qu'une population cellulaire en phase stationnaire.

D'une façon générale, les cellules sont alors ensemencées à raison de 10^6 cellules/ml de milieu frais et récoltées par centrifugation au milieu de la phase exponentielle, c'est à dire à environ 10^7 cellules/ml dans nos conditions. Le culot cellulaire est lavé deux fois à l'eau distillée en vue de manipulations ultérieures. Le stade de développement de la culture est estimé par comptage en cellules de Malassez, aussi bien dans le cas des cellules entières que des protoplastes. Ce mode de comptage nous permet également d'exprimer certaines activités spécifiques en moles de substrat transformé par minute et par cellule.

D. DOSAGE DES PROTEINES, EXPRESSION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET DOMAINE DE LINEARITE DE CES ACTIVITES.

Les protéïnes sont dosées dans les extraits acellulaires par la méthode de Lowry. (40).

Les activités enzymatiques spécifiques seront exprimées en moles de substrat transformé par minute et par milligramme de protéïne. Pour ne pas avoir à le répéter à chaque chapître, notons dès maintenant que pour toutes les valeurs fournies dans les résultats, l'activité enzymatique mesurée était fonction linéaire du temps de dosage et de la concentration en protéïnes de l'extrait enzymatique.

E. DOSAGE STANDARD DES GUANINE ET ADENINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES.

L'APRT catalyse la réaction suivante :

Adénine + PRPP $\longrightarrow$ AMP + PP

La G-PRT catalyse les réactions suivantes :

Guanine + PRPP $\longrightarrow$ GMP + PP

Hypoxanthine + PRPP $\longrightarrow$ IMP + PP

Xanthine + PRPP $\longrightarrow$ XMP + PP

1) Préparation des extraits

Après deux lavages à l'eau distillée, 100 g de cellules en poids humide sont suspendues dans 150 ml de tampon A (phosphate de potassium 0,1 M pH 7,8, contenant 15 % de glycérol V/v et 0,1 % de dithiothréïtrol v/v) et sont broyées dans un broyeur Braun en présence de 200 g de billes de verre. Cette suspension est centrifugée pendant 45 minutes à 30.000 tours par minute. Le surnageant constitue l'extrait brut.

2) Dosage

Pour un volume final de 250 μl, le mélange d'incubation est 150 mM en tampon glycine-NaOH pH 9,25, 4,6 mM en $MgCl_2$, 0,11 mM en ($^{14}C_8$) guanine ou($^{14}C_8$)adénine (51,5 mCi/mmoles) et 0,4 mM en PRPP.

Ce mélange est porté à 37°C et la réaction est amorcée par l'addition de l'enzyme ; après 10 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans un bain-marie à 100°C pendant une minute. Le précipité protéïque est éliminé par centrifugation. Deux microlitres du surnageant sont déposés sur une feuille de cellulose Eastman Kodak avec indicateur fluorescent et chromatographiés dans une solution molaire d'acétate d'ammonium. (Rf respectifs de l'adénine, L'AMP, la guanine, et le GMP: 0,28 ; 0,61 ; 0,28 ; 0,70).

Les taches correspondant à l'AMP ou au GMP radioactifs sont repérées par lecture UV, découpées et comptées dans un spectrophotomètre à scintillation liquide (Packard Tricarb 3320).

F. ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE.

1) Développement du gel.

Après polymérisation du gel à 7,5 % d'acrylamide, 10 à 100 µl d'extrait,mélangés à une goutte de solution 0,5 % de bleu de Bromophénol et 30 % de sucrosesont déposés sur le gel. Le tampon utilisé pendant l'électrophorèse contient 3,66 % de tris et 2,8 % de glycine.
Les gels reçoivent chacun un courant de 3 milliampères. La séparation des protéïnes de l'échantillon se poursuit pendant 2 à 3 Heures dans une enceinte thermostatée à 4°C.

2) Coloration des protéïnes du gel.

Les gels sont plongés dans une solution à 12,5 % d'acide trichloracétique. Après fixation des protéïnes, une solution à 0,25 % de Bleu de Commassie brillant et 7 % d'acide acétique est utilisée pour colorer les bandes protéïques. Après décoloration par de l'acide trichloracétique concentré, les gels peuvent être conservés dans une solution aqueuse d'azide de sodium.

3) Localisation desprotéïnes.

Le gel ainsi coloré défile devant la fente du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm déterminant ainsi une représentation graphique des bandes de protéïnes qu'il contient.

4) Localisation de l'activité phosphoribosyltransferase.

Le gel, dans ce cas, n'est pas coloré. Il est découpé en tranches de 1,5 à 2 mm d'épaisseur dès la fin de l'électrophorèse. Chaque tranche est déposée dans un tube avec le mélange d'incubation pour le dosage de l'enzyme. L'incubation dure 2 heures à 30°C. Puis un aliquot est chromatographié afin de déterminer la quantité de mononucléotides radioactifs formés.

G. FOCALISATION ISOELECTRIQUE.

La focalisation a lieu dans un appareil Desaga sur un gel d'acrylamide de 18 cm sur 4 cm avec de l'ampholine pH 3,5 à pH 10. 900 µl d'extrait brut sont mélangés à la solution d'ampholine avant la polymérisation du gel.

Le courant est maintenu à 5 mA pendant environ 6 Heures. L'hémoglobine, utilisée comme marqueur, présente dans ces conditions une focalisation en deux bandes étroites. L'électrode positive est mise à tremper dans une solution molaire d'acide citrique, la négative dans de la soude molaire, avant l'électrophorèse.

H. MESURE DE L'ACTIVITE PRPP SYNTHETASE.

1) Préparation des extraits acellulaires.

Les cellules de souches sauvages ou mutantes, récoltées pendant la phase exponentielle (aux environs de 10^7 cellules/ml) sont lavées deux fois à l'eau distillée. Toutes les opérations suivantes se déroulent à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon A (décrit au paragraphe E), et est broyé pendant 20 minutes dans un mortier en présence de Kieselguhr (Merck). Pour 1 g de cellules en poids humide, on ajoute dans le mortier 1,5 g de kieselguhr et 1 ml de tampon A. Lorsque les 20 minutes sont écoulées, le même volume de tampon est ajouté à la préparation et le broyage se poursuit pendant 5 autres minutes. La pâte onctueuse et très fluide ainsi obtenue est centrifugée pendant 30 minutes à 4000 tours/minutes.

Le surnageant récolté est alors centrifugé 15 minutes à 19000 tours/minute. Le culot est éliminé et l'extrait brut est dialysé 24 Heures contre un tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7,8 avec 10 % de glycérol. 40 % (w:v) de polyéthylène glycol 6000 sont ajoutés à l'extrait brut dialysé. La mixture obtenue est centrifugée 15 minutes à 20.000 tours/minute pour éliminer les protéïnes précipitées. Le surnageant,appelé "fraction PEG", est testé pour son activité PRPP synthétase.

2) Dosage de la PRPP synthétase

Le procédé utilisé dérive de la méthode déjà décrite par J. Flaks (41). L'activité enzymatique est mesurée par la conversion du PRPP, produit à partir de l'ATP et du ribose 5 phosphate, en OMP radioactif en utilisant de l'acide orotique marqué au carbone 14 (51 mCi/mmole) et une préparation commerciale d'orotate phosphoribosyltransferase. Le mélange d'incubation,pour un volume final de 220 microlitres, est 30 mM en tampon phosphate de potassium pH 7,8, 20 mM en $MgCL_2$, 0,22 mM en $^{14}C_8$ acide orotique (2,5 mCi/mmole), 1,2 mM en R-5-P sel de sodium, 0,32 mM en ATP sel disodique, 4 mM en glutathion réduit. Il contient en outre 3,5 milliunités d'orotate phosphoribosyltransferase. Un système de régénération de l'ATP est ajouté au mélange d'incubation : 5 unités de pyruvate kinase (E.C. 2.7.1.40) et 3,6 mM en phosphoénolpyruvate.

La réaction est initiée par l'addition de l'extrait, d'une façon générale 50 microlitres de la "fraction PEG" ; après 10 minutes d'incubation à 37°C, les tubes sont plongés une minute dans l'eau bouillante. Les protéïnes dénaturées sont éliminées par centrifugation. Deux microlitres du surnageant, déposés sur une feuille de cellulose Eastman, avec indicateur fluorescent, sont chromatographiés pour séparer l'orotate marqué de l'OMP et l'UMP radioactif. (la préparation industrielle d'orotate phosphoribosyltransferase étant contaminée par environ 5 % d'OMP décarboxylase). Le système de séparation a été décrit par Pataki : sulfate d'ammonium saturé : isopropanol : eau (79 : 2 : 19, v/v). Les feuilles sont séchées 10 minutesà 85°C. Les deux taches correspondant à l'OMP et à l'UMP, mises en évidence par lecture sous une lampe UV, sont découpées et placées dans des fioles de comptage avec 2 ml d'un liquide de scintillation (5 g de PPO + 30 mg de POPOP + 1 litre de toluène). On a vérifié que l'excès d'O-PRT commerciale utilisée était suffisant, même en présence des inhibiteurs de la PRPP synthétase susceptiblesd'inhiber également l'activité O-PRT.

I. DETERMINATION DU POOL INTRACELLULAIRE DE PRPP.

1) Extraction du pool de PRPP.

La levure est cultivée comme précédemment. 2 à 3 10^9 cellules sont récoltées sur un filtre millipore. Le filtre est imbibé avec 0,4 ml d'éthanol à 90°C froid, puis plongé dans 4 ml d'acide acétique molaire à 0°C, et le tout est agité vigoureusement pendant 5 minutes. Au cours de ce traitement, les cellules se détachent aisément du filtre. 3 millilitres de la suspension cellulaire obtenue, sont lyophilisés pendant 6 Heures. La poudre obtenue est suspendue dans 1,5 ml de tampon Hépes-NaOH 0,2 M pH 7,6 et centrifugée à 2500 tours/minute pendant 20 minutes. Le surnageant est traité avec 20 mg de charbon Norit A pendant 10 minutes à 4°C, afin d'adsorber les nucléotides endogènes, puis recentrifugé. Ce nouveau surnageant limpide est utilisé pour la détermination du pool de PRPP.

2) Dosage du PRPP.

Le PRPP est mesuré par conversion de l'orotate marqué en OMP et UMP radioactif avec l'aide d'une préparation commerciale d'OPRT-OMP décarboxylase.

Pour un volume final de 200 microlitres, le mélange d'incubation est 80 mM en Hepes-NaOH pH 7,6, 1 mM en Mg Cl_2, 3,5 mu d'OPRT, 100 μM en $^{14}C_8$ acide orotique (51 mCi/mmole). 20 μl d'extrait sont utilisés pour initier la réaction. La détermination quantitative de l'OMP et de L'UMP marqués se fait de la même façon que pour la PRPP synthétase, si ce n'est que l'on dépose 5 μl du mélange d'incubation,au lieu de 2 μl, sur les feuilles de cellulose.

J. DOSAGE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE.

Glucose 6P + NADP $\longrightarrow$ Gluconate 6P + NADPH + H^+

L'activité enzymatique a été mesurée d'après G.F. Domagk et Sörensen (42).

K. METHODE D'OBTENTION DES PROTOPLASTES.

S. Pombe est cultivé sur milieu YPGT, après 48 Heures de préculture liquide sur ce même milieu. 10^9 cellules, récoltées en phase exponentielle, sont lavées à l'eau distillée stérile et resuspendues dans 10 ml d'une solution contenant du Tris 100 mM de l'EDTA 5 mM et du dithiothreitrol 5 mM, ajustée à pH 8 avec HCl. Après 15 minutes d'incubation à 30°C, les cellules sont centrifugées et lavées à l'eau distillée stérile. Les levures sont alors incubées, à raison de 10^9 cellules/ml, dans un milieu contenant 2 volumes de KCl 1,2 M, 1 volume de dithiothreitrol 20 mM, 1 volume d'enzyme d'escargot(Industrie Biologique Française), auquel sont ajoutés 5 mg de α (1 $\longrightarrow$ 3) glucanase par ml (3 unités par mg) et 5 mg de β (1 $\longrightarrow$ 3) glucanase par ml (10 unités par mg). Ce mélange est centrifugé 15 minutes à 12.000 g avant sa mise en présence avec les cellules. L'incubation de 90 minutes à 30°C, conduit à la transformation de 99 % à 100 % de cellules en protoplastes. Ces protoplastes sont centrifugés, lavés deux fois avec une solution contenant de l'acide 2-N-morpholinoethane sulfonique (MES) 50 mM, du mannitol 0,6 M et du KCl 0,2 M. Ils peuvent être conservés 72 Heures à 4°C dans ce milieu. (66)

L. MESURE DE "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES PAR LES CELLULES ENTIERES.

1) PREPARATION DES CELLULES,

Les cellules sont cultivées comme décrit précédemment. Après filtration sur filtre Whatman GF/B, celles-ci sont immmédiatement resuspendues dans du milieu frais tamponné et préchauffé à 30°C, à raison de 2,5 10^6 cellules/ml ; elles sont conservées pendant au moins 10 minutes dans ces conditions.

2) TECHNIQUE DE L'ESSAI.

La méthode utilisée dérive de la technique classique de filtration rapide telle qu'elle a été décrite par Mitchison et Gross.(43)
La réaction est déclenchée en ajoutant 1 ml de la suspension cellulaire à 1 ml de milieu réactionnel contenant la base purique radio-active en solution dans du milieu d'incubation.

La réaction se fait pendant une minute dans un bain-marie à 30°C. Elle est arrêtée en ajoutant au milieu réactionnel,de 2 ml,environ 30 ml d'une solution d'adénine froide à 0°C. Ainsi l'arrêt de la réaction est assuré à la fois par dilution isotopique et par l'action du froid qui inhibe le transport. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont conservées un minimum de temps avant la filtration.
Les cellules sont filtrées sur Whatman GF/B et lavées en deux fois avec 50 ml d'eau distillée à la température du laboratoire. Les filtres sont séchés 30 minutes à 85°C, puis passés dans un compteur Packard en présence de liquide de scintillation. Pour les études cinétiques, nécessitant un nombre important de mesures, les incubations sont décalées de 15 secondes,ce qui permet de négliger les variations pouvant être imputées à la croissance de la levure pendant le temps de l'expérience.

Les tubes témoins ne sont pas incubés, mais subissent immédiatement la dilution par la base purique froide.

M. MESURE DE L"UPTAKE" DES BASES PURIQUES PAR LES PROTOPLASTES.

La mesure de "l'uptake" chez les protoplastes diffère de celle décrite pour les cellules entières en raison de la fragilité de ces organismes,qui rend impossible une filtration sous vide. Les protoplastes, séjournant dans le milieu de conservation décrit précédemment, sont centrifugés et resuspendus à raison de $2\ 10^7$ protoplastes/ml dans une solution contenant du MES 50 mM, du KCl 50 mM, du glucose 50 mM et du mannitol 0,6 M, ajustée à pH 5 par KOH ("milieu MMG"). La suspension est maintenue pendant 10 minutes dans un bain-marie à 30°C. Des échantillons de 1 ml sont mélangés à un volume égal de $^{14}C_8$ guanine 10 μM, également en milieu MMG (10 mCi/mmole), et incubés à 30°C. Aux temps indiqués, la réaction est arrêtée par addition de 2 ml de milieu MMG à 0°C contenant de l'azide de sodium 40 mM et de la guanine froide 0,27 mM.

La suspension protoplastique est alors centrifugée à 12.000 g pendant 2 minutes et le culot est lavé deux fois avec 4 ml de milieu MMG. Après centrifugation, 0,3 ml d'eau et 0,5 ml de hyamine-HCl sont ajoutés au culot de protoplastes et la mixture est transférée dans une fiole de scintillation avec une pipette pasteur. Le tube d'essai est rincé,en trois fois,avec 10 ml d'une solution de scintillation (5 g de PPO et 100 g de naphtalène par litre de dioxane) qui sont ajoutés dans la fiole de comptage.

La radioactivité est mesurée dans un scintillateur Tricarb Packard et les coups par minute sont convertis en mole de guanine absorbée par protoplaste.

Deux contrôles sont faits à chaque expérience :

- les protoplastes sont suspendus dansdu milieu MMG contenant de la $^{14}C_8$ guanine 5 μM, du NaN_3 40 mM, et de la guanine froide 0,27 mM. Cette suspension est centrifugée immédiatement et comptée en scintillation liquide.

- Un échantillon du culot de protoplastesest resuspendu dans 300 μl d'eau stérile pour faire éclater ces derniers et "l'uptake" de la guanine est mesuré, permettant ainsi de voir le pourcentage de guanine absorbée par les cellules entières.

Les deux contrôles avaient des valeurs inférieures à 1 % de celle des protoplastes intacts. (66). Nous avons également fait des contrôles du "quenching" dû à l'eau ajoutée dans les fioles de comptage.

N. METHODE D'OBTENTION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE S. POMBE.

Toutes les opérations décrites ci-dessous se déroulent à 4°C. Environ 5.10^9 protoplastes sont suspendus dans 5 ml d'une solution contenant du tampon Hepes 50 mM pH 7,4, du sorbitol 1 M, du $MgCl_2$ 0,5 mM.
On y ajoute un volume de billes de verre (diamètre 0,45 mm) équivalent au volume de liquide. L'ensemble est agité à la main dans un bain-marie à 0°C pendant 10 minutes. L'éclatement des protoplastes est vérifié sous microscope. Le lysat et les deux solutions de lavage des billes de verre, sont centrifugés à 2000 tours/minute pendant 10 minutes. Le culot obtenu, constituant "la fraction membranaire lourde" est lavé trois fois,avec une homogénéisation de la suspension à l'aide d'un potter entre le 2ème et le 3ème lavage,et son activité phosphoribosyltransferase est testée.

Le surnageant du lysat est centrifugé à 30.000 tours/minute pendant 10 minutes. Le culot, constituant"la fraction membranaire légère" est également lavé trois fois et testé pour son activité PRT . Le surnageant du lysat donne la valeur de l'activité enzymatique cytosoluble.
La glucose-6-phosphate deshydrogénase est utilisée comme marqueur cytosoluble.

O . ORIGINE DES PREPARATIONS COMMERCIALES.

Les produits radioactifs nous ont été fournis par le CEA France. Le sel dimagnésique de PRPP vient de P.L. Biochemicals. Nous avons obtenu les préparations commerciales enzymatiques de Boehringer. Le ribose 5 phosphate et les différents nucléotides ont été achetés chez Sigma.
La pureté de ces nucléotides a été vérifiée par chromatographie. Tous les autres produits chimiques étaient de la plus grande pureté disponible sur le marché.
Les α (1 $\longrightarrow$ 3) et β (1 $\longrightarrow$ 3) glucanases nous ont été aimablement fournies par le Docteur REESE, US Army Laboratories, Natick, Mass. U.S.A.

DE DE "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS DE S. POMBE

Rappelons que les travaux,rapportés dans l'introduction,de Hoffmeyer Zimmermann Hochstadt-Ozer d'une part, et de Pourquié et de Groodt sur les mutants de S. Pombe présentés dans le tableau I d'autre part, nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les PRTs pouvaient intervenir dans le mécanisme"d'uptake " des bases puriques chez S. Pombe.

Il était donc important d'étudier chez la souche sauvage et les différents mutants affectés au niveau des PRTs ou au niveau de l"uptake" des bases puriques, les facteurs dont dépend le transport.

Nous étudierons plus précisément dans ce chapitre la dépendance de "l'uptake" vis à vis de la teneur en ammonium du milieu, du pH du mélange d'incubation pendant la mesure de la perméation, du stade de croissance de la levure, des inhibiteurs des PRTs et du PRPP. Mais avant de voir en détail le comportement de ces différentes souches vis à vis des variations des facteurs ci-dessus, nous allons décrire les mutants de S. Pombe à l'aide du tableau I afin de les caractériser et de les situer les uns par rapport aux autres.

- La souche pur 1, déficiente en GPRT, absorbe très mal la guanine et l'hypoxanthine et excrète très fortement cette dernière. Sa couleur rouge, sur milieu complet, dûe à l'accumulation d'un intermédiaire de la voie de novo, l'AIR, traduit une forte accélération de cette voie de biosynthèse (46). Nous avons vérifié que "l'uptake" également très bas du double mutant pur 1 - ade 1, bloqué dans la voie de novo, nous assure que l'entrée des bases puriques chez pur 1 est perturbée par l'absence d'activité de la GPRT et non par l'accumulation intra-cellulaire,possible chez ce mutant, d'un métabolite de la voie de biosynthèse de novo. Enfin, toujours concernant les phénomènes "d'uptake", Nagy et Reichert ont montré que la souche pur 1 n'accumulait pas d'hypoxanthine intra-cellulaire, alors que les mutants bloqués dans la voie de novo après L'IMP (par exemple le mutant Ade 2 dépourvu d'activité s-AMP synthétase), donc accumulant l'IMP, stockent jusqu'à 300 fois la concentration externe de la base. Ce fait tendrait à prouver que la GPRT serait nécessaire à la possibilité d'accumulation de l'hypoxanthine et de l'inosine à l'intérieur de la cellule.

TABLEAU II

DEPENDANCE DE "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES VIS A VIS DE LA TENEUR EN AMMONIUM DU MILIEU A pH 4. (LES CELLULES SONT RECOLTEES A L'OPTIMUM "D'UPTAKE").

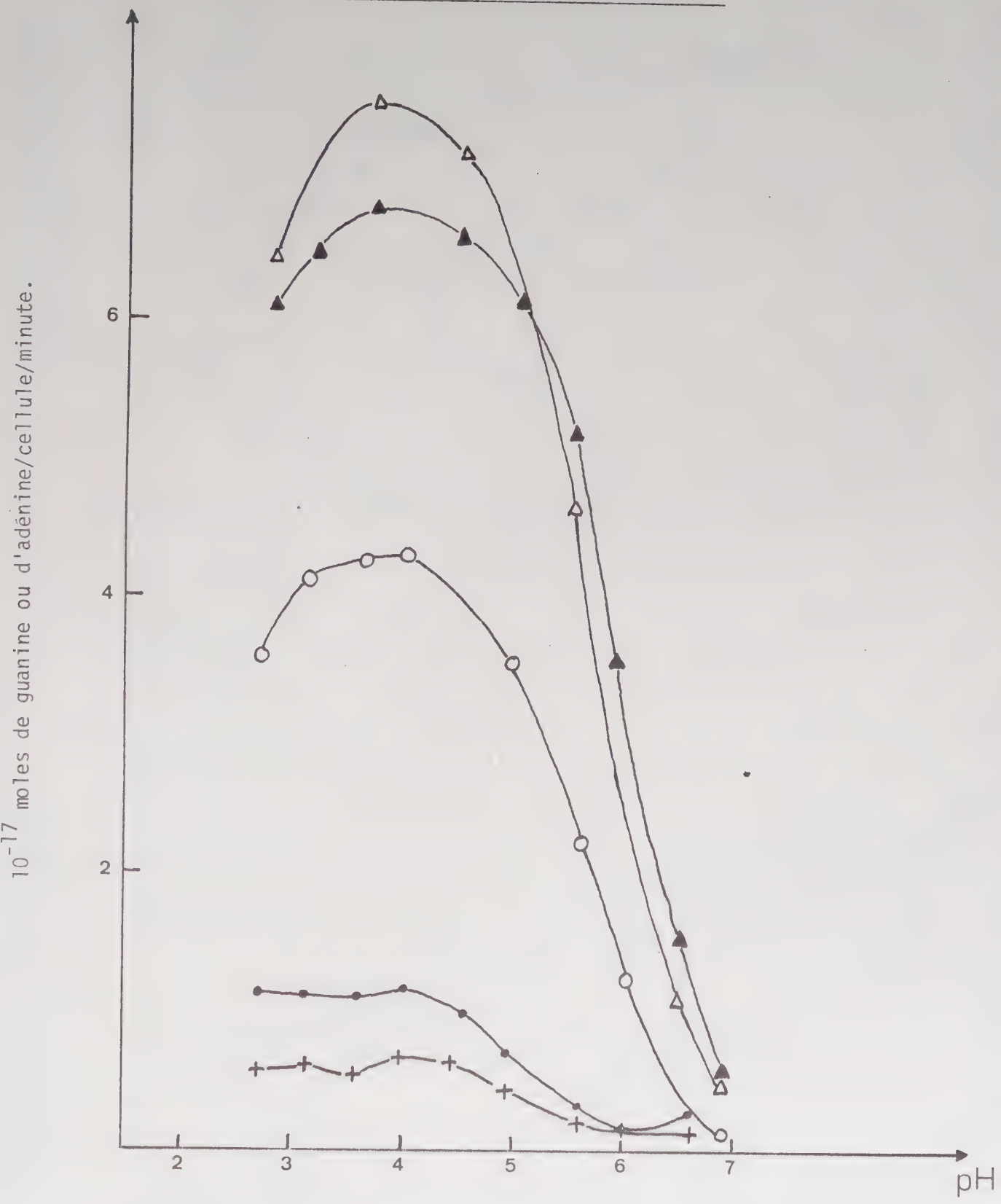
	ADENINE		GUANINE	
	N 100	N 5000	N 100	N 5000
972 h⁻	100 % 7,2-7,3	100 % 7,1-7,4	100 % 4,2±0,1	100 % 4,0±0,1
gup 1	95 %	55 %	60 %	8 %
pur 1	100 %	58 %	20 %	10 %
dap 1	65 %	60 %	100 %	100 %
1 dap 1	45 %	non mesuré	25 %	non mesuré

- Les résultats, aussi bien pour l'adénine que pour la guanine, sont exprimés en pourcentages d'activité relative "d'uptake" en prenant comme référence les valeurs de la souche sauvage pour chaque base purique sur les différents milieux.

- Les chiffres indiqués, sous les pourcentages, pour la souche sauvage correspondent aux valeurs "d'uptake" de guanine et d'adénine exprimées en 10^{-17} mole de base purique absorbée par cellule et par minute.

FIGURE 2

EFFET DU pH SUR "L'UPTAKE" D'ADENINE ET DE GUANINE DES SOUCHES SAUVAGE ET pur 1 CULTIVEES SUR MILIEU MMA N100 et MMA N5000.



▲ : "Uptake" adénine souche sauvage sur MMA N100

△ : "Uptake" adénine souche pur 1 sur MMA N100

○ : "Uptake" guanine souche sauvage sur MMA N100

• : "Uptake" guanine souche pur 1 sur MMA N100

\+ : "Uptake" guanine souche pur 1 sur MMA N5000

FIGURE 1 A

EFFET DU pH SUR "L'UPTAKE" D'ADENINE
EN MILIEU MMA N100 ET MMA N5000.

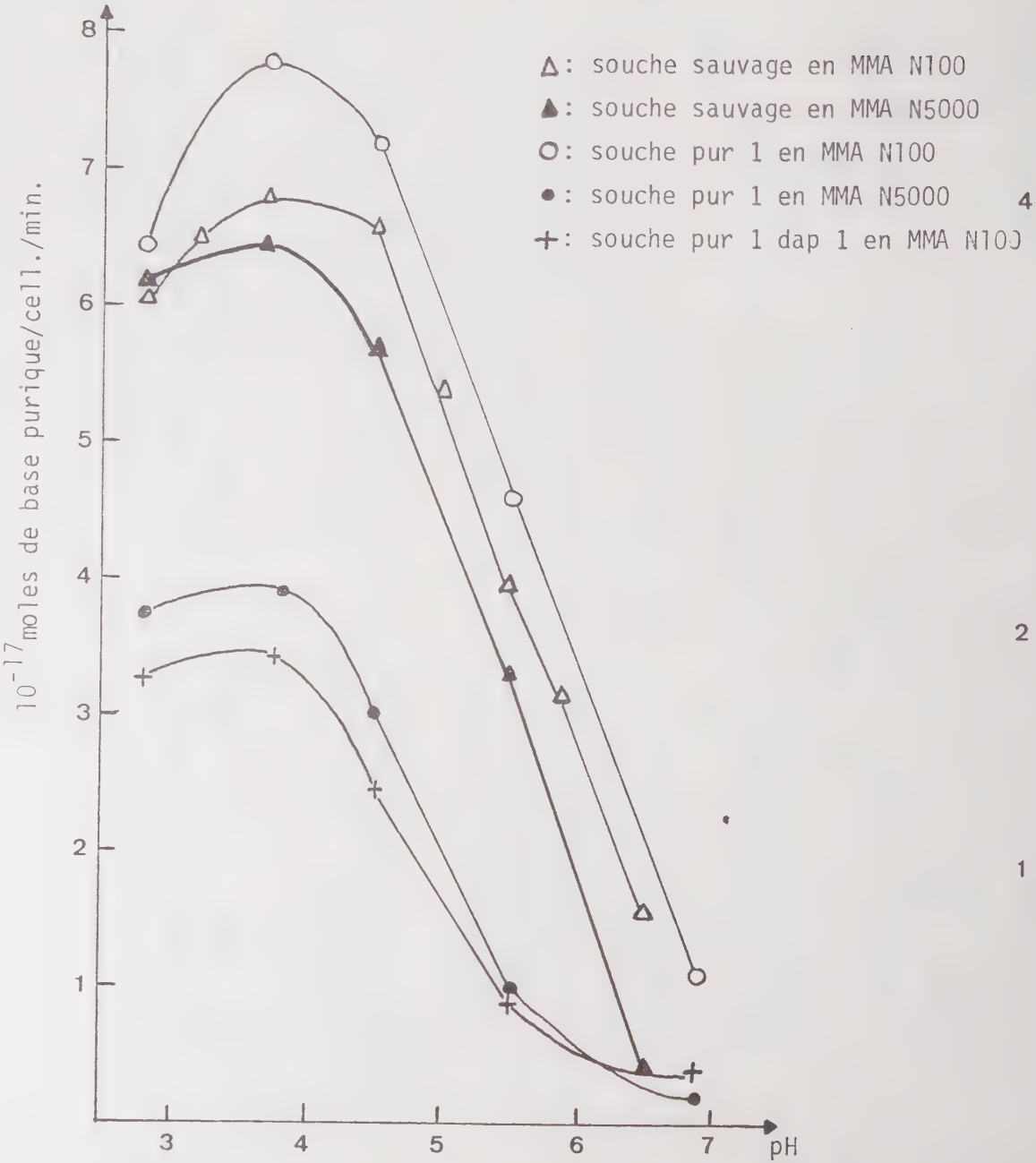
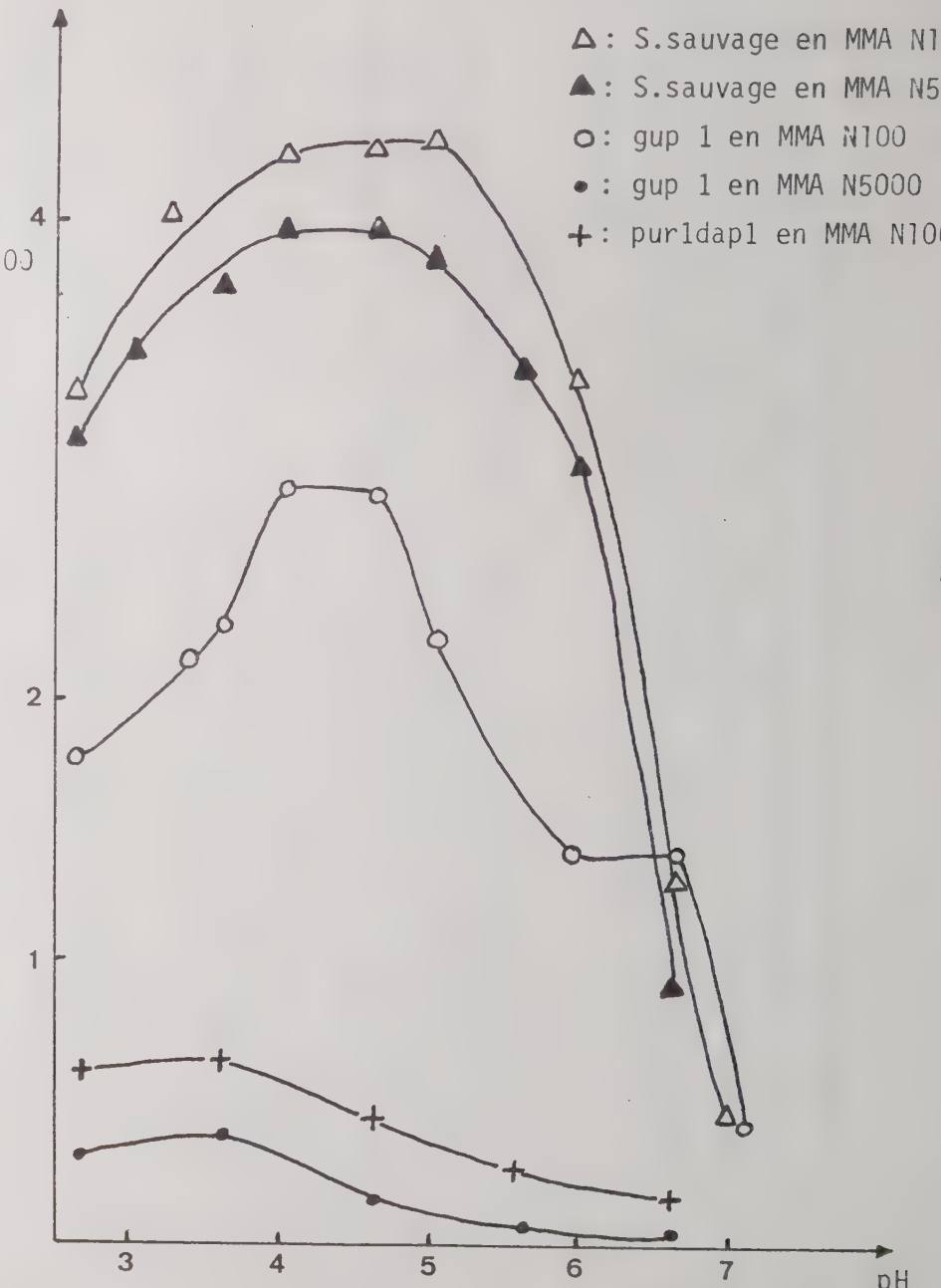


FIGURE 1 B

EFFET DU pH SUR "L'UPTAKE" DE GUANINE
EN MILIEU MMA N100 ET MMA N5000



- La souche dap 1, déficienteen APRT, présente,contrairement à pur 1, la même couleur que la souche sauvage sur milieu complet ; ceci peut signifier que sa voie de biosynthèse de novo n'est pas affectée. Nous verrons dans ce chapitre que "l'uptake" d'adénine chez cette souche est affecté,alors que "l'uptake" de guanine est identique à celui de la souche sauvage.

- Le double mutant pur 1 dap 1, dépourvu d'activité GPRT et APRT, présente, comme pur 1, une forte accélération de la voie de novo qui se traduit par une couleur rouge très marquée sur milieu complet. Nous verrons que cette souche a un "uptake" d'adénine et de guanine affecté.

- La souche gup 1 présente des activités APRT et GPRT apparemment identiques à la souche sauvage in vitro. Par contre, nous verrons que sa capacité "d'uptake" des bases puriques est affectée.

I - DEPENDANCE DE "L'UPTAKE" VIS A VIS DE LA TENEUR EN AMMONIUM DU MILIEU.

Schwencke et Grenson ont déjà rapporté des effets répressifs des ions NH_4^+ sur l'activité des perméases chez d'autres organismes.(47,48) Les effets des ions ammonium sur les différentes souches de S. Pombe sont illustrés par le tableau II et les figures 1 et 2.

Observons tout d'abord que la souche sauvage a le même "uptake" aussi bien de l'adénine que de la guanine, sur milieu N100 et sur milieu N5000.

Alors que la souche sauvage et dap 1 présentent un "uptake" des bases puriques indépendant de la concentration en ions NH_4^+ du milieu de culture, la souche pur 1 présente un "uptake" d'adénine diminué d'environ 40 % en milieu N5000 par rapport à celui observé en N100. Notons d'ailleurs que sur milieu N100 pauvre en ammonium, pur 1 absorbe l'adénine comme la souche sauvage (figure 1A).
"L'uptake" de la guanine chez cette même souche sur milieu N100 ne représente que 20 % de celui de la souche sauvage et est réduit à 10 % seulement sur milieu N5000 (figure 2).

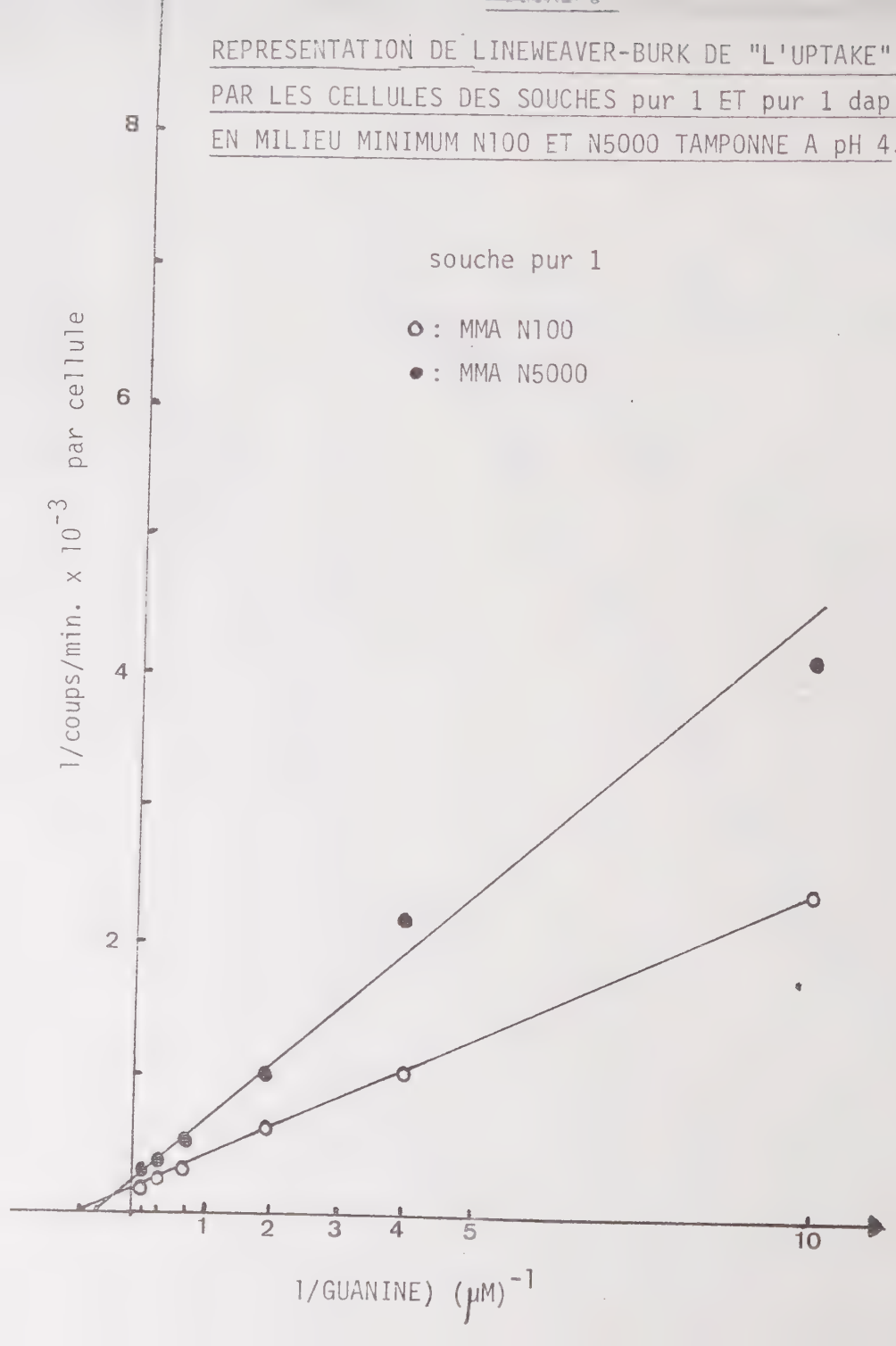
Comme le montre la figure 1B, et le tableau II, la souche gup 1 présente des "uptakes" d'adénine et de guanine beaucoup plus réduits sur milieu N5000 que sur milieu N100.

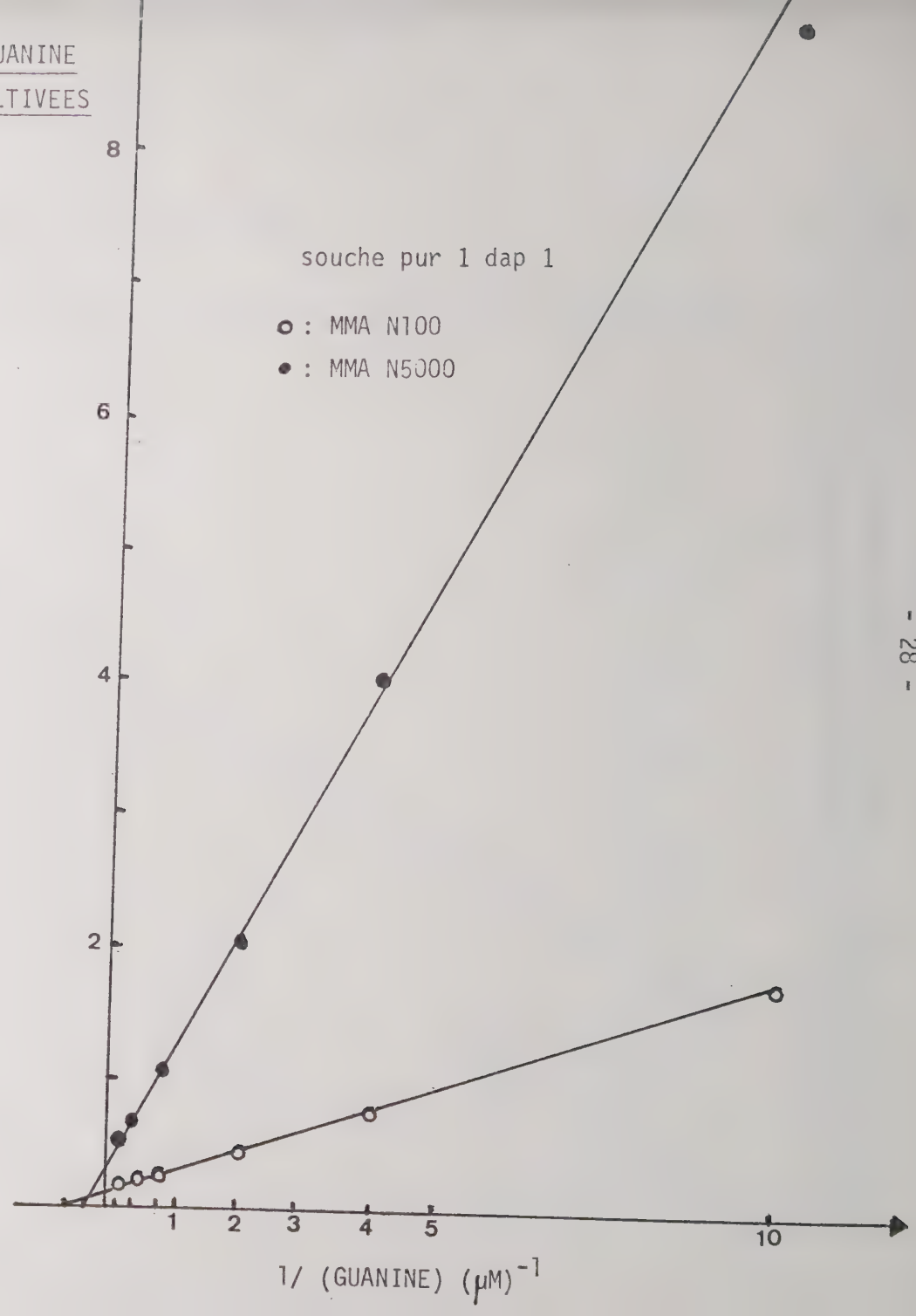
TABLEAU III

CONSTANTES CINETIQUES DE "L'UPTAKE" DE GUANINE DES SOUCHES ETUDIEES

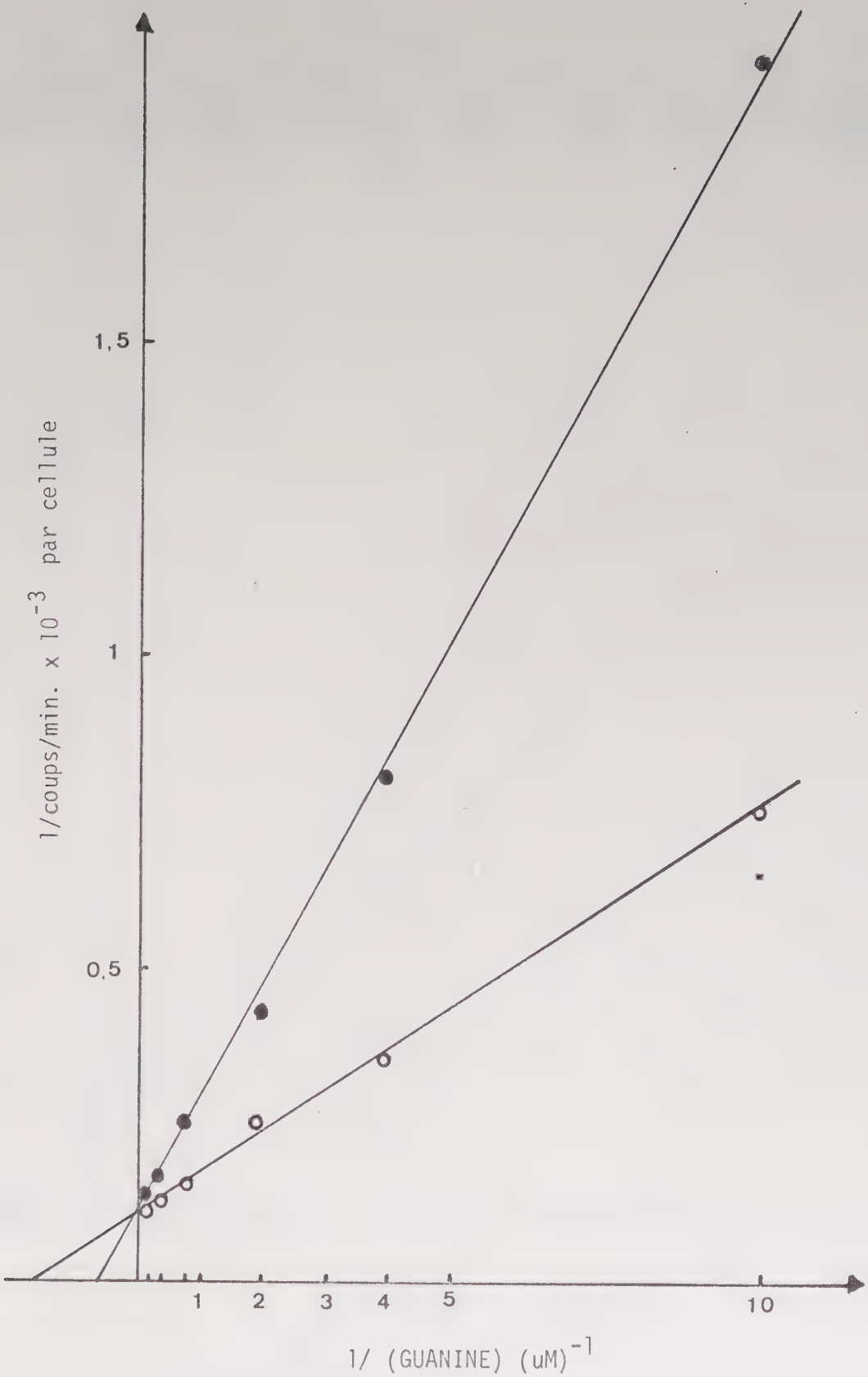
	MILIEU N 100		MILIEU N 5000	
	K_m	V_{max} mole/cell/min.	K_m	V_{max} mole/cell/min.
972 h^-	0,66 µM	$11,5 \cdot 10^{-17}$	0,76 µM	$9,7 \cdot 10^{-17}$
gup 1	0,64 µM	$4,9 \cdot 10^{-17}$	1,75 µM	$5,1 \cdot 10^{-17}$
pur 1	1,43 µM	$2,8 \cdot 10^{-17}$	2,0 µM	$2,45 \cdot 10^{-17}$
ur1 dap 1	1,66 µM	$2,0 \cdot 10^{-17}$	3,3 µM	$1,41 \cdot 10^{-17}$

REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK DE "L'UPTAKE" DE GUANINE PAR LES CELLULES DES SOUCHES pur 1 ET pur 1 dap 1 CULTIVEES EN MILIEU MINIMUM N100 ET N5000 TAMPONNE A pH 4.





REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK DE "L'UPTAKE" DE GUANINE PAR LES CELLULES DE LA SOUCHE gup 1 CULTIVEE EN MILIEU MINIMUM N100 et N5000 TAMPONNE A pH 4.

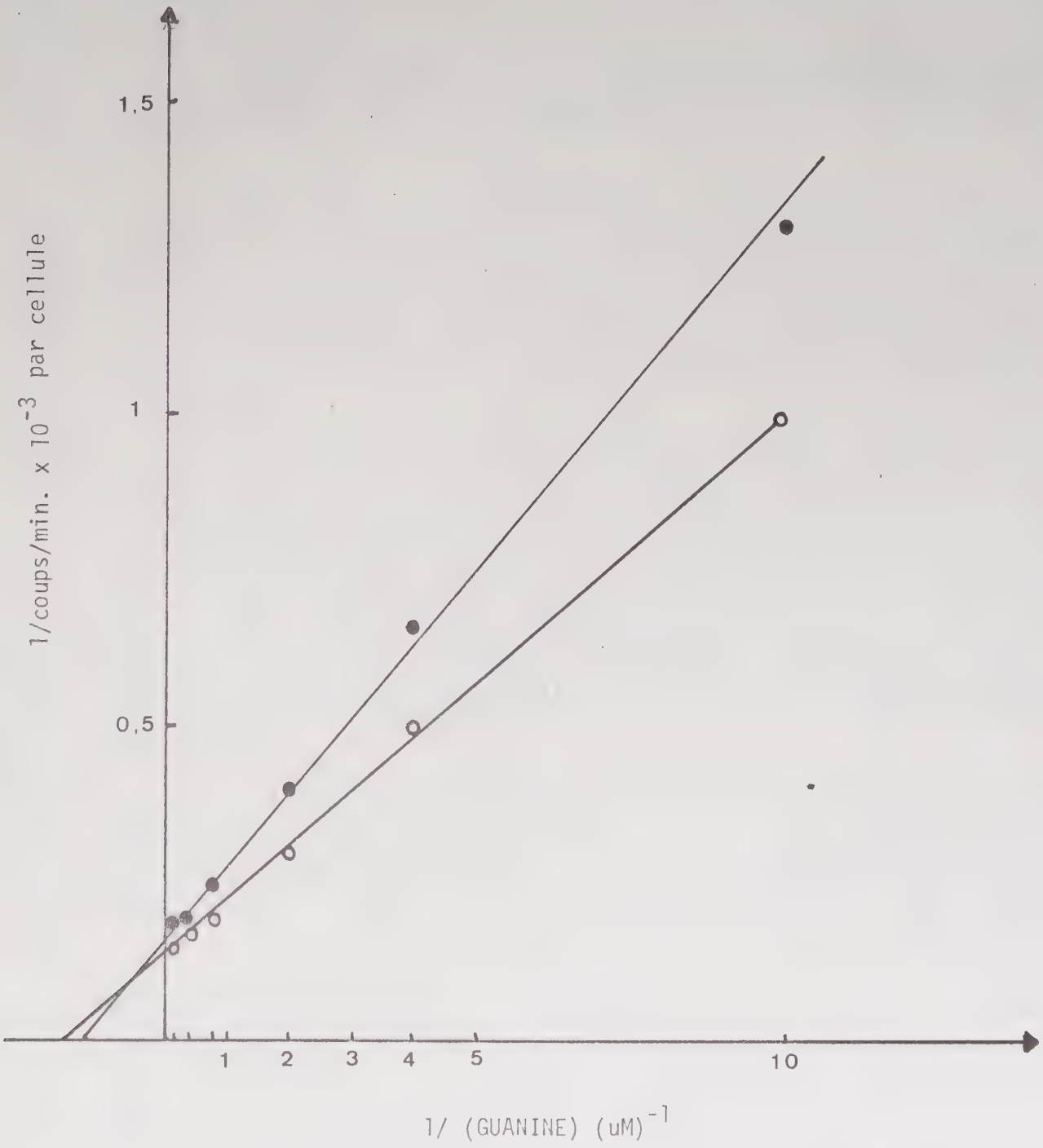


○ : MMA N100

● : MMA N5000

FIGURE 7

REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK DE "L'UPTAKE" DE GUANINE PAR LES CELLULES DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE EN MILIEU MINIMUM N100 et N5000 TAMPONNE A pH 4.



La valeur de "l'uptake" de l'adénine pour gup1 sur N100 représente 90 % de celle observée chez la souche sauvage, et seulement 55 % sur milieu N5000. En ce qui concerne la guanine, la valeur de "l'uptake" sur N100 représente environ 60 % de celle de la souche sauvage et seulement 10 % sur N5000.

Le double mutant pur1 dap 1 présente, sur milieu N100, un "uptake" d'adénine plus affecté que le simple mutant dap 1 et un "uptake" de guanine aussi affecté que celui du mutant pur 1.

En résumé, si les souches 972 h^- et dap 1 semblent avoir des "uptakes" de guanine et d'adénine indépendants de la teneur en ammonium du milieu, il n'en est pas de même pour pur 1 et surtout gup1 dont les "uptakes" de bases puriques sont dépendants des variations de ce facteur: un accroissement de la concentration en ammonium entrainant une baisse de "l'uptake".

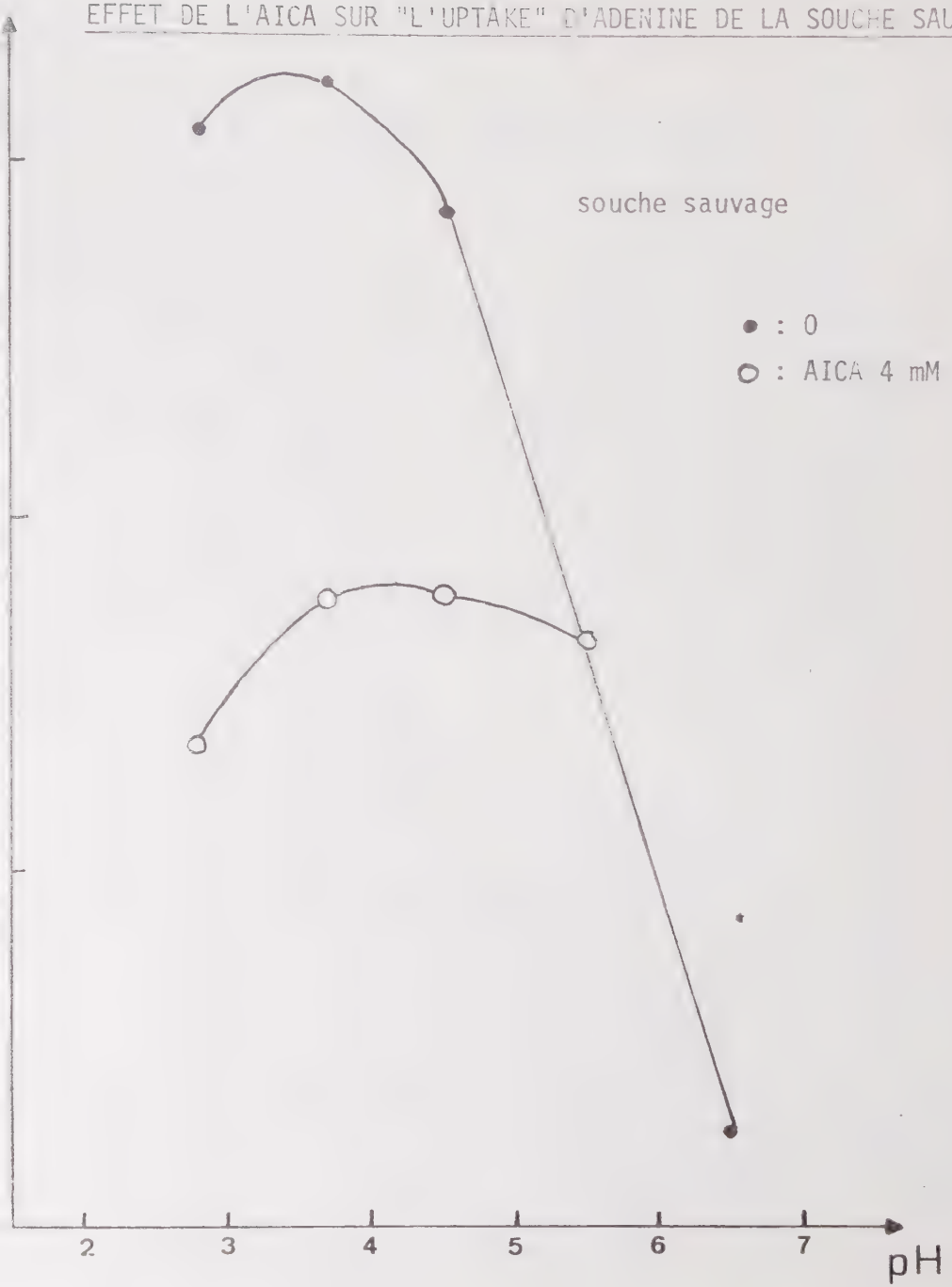
Le tableau III résume les constantes cinétiques de l"uptake" de guanine chez la souche sauvage et les différents mutants à pH 4. Les valeurs sont issues des figures 5 et 6. Ce tableau nous montre d'abord que quelque soit la concentration en ammonium, les mutations au niveau des PRTs chez pur1 et pur 1 dap1 entrainent une diminution d'affinité pour la guanine et une diminution de Vmax. Notons que la diminution d'affinité des souches mutantes vis à vis de la guanine est un peu plus sensible sur milieu N5000 que sur N100.

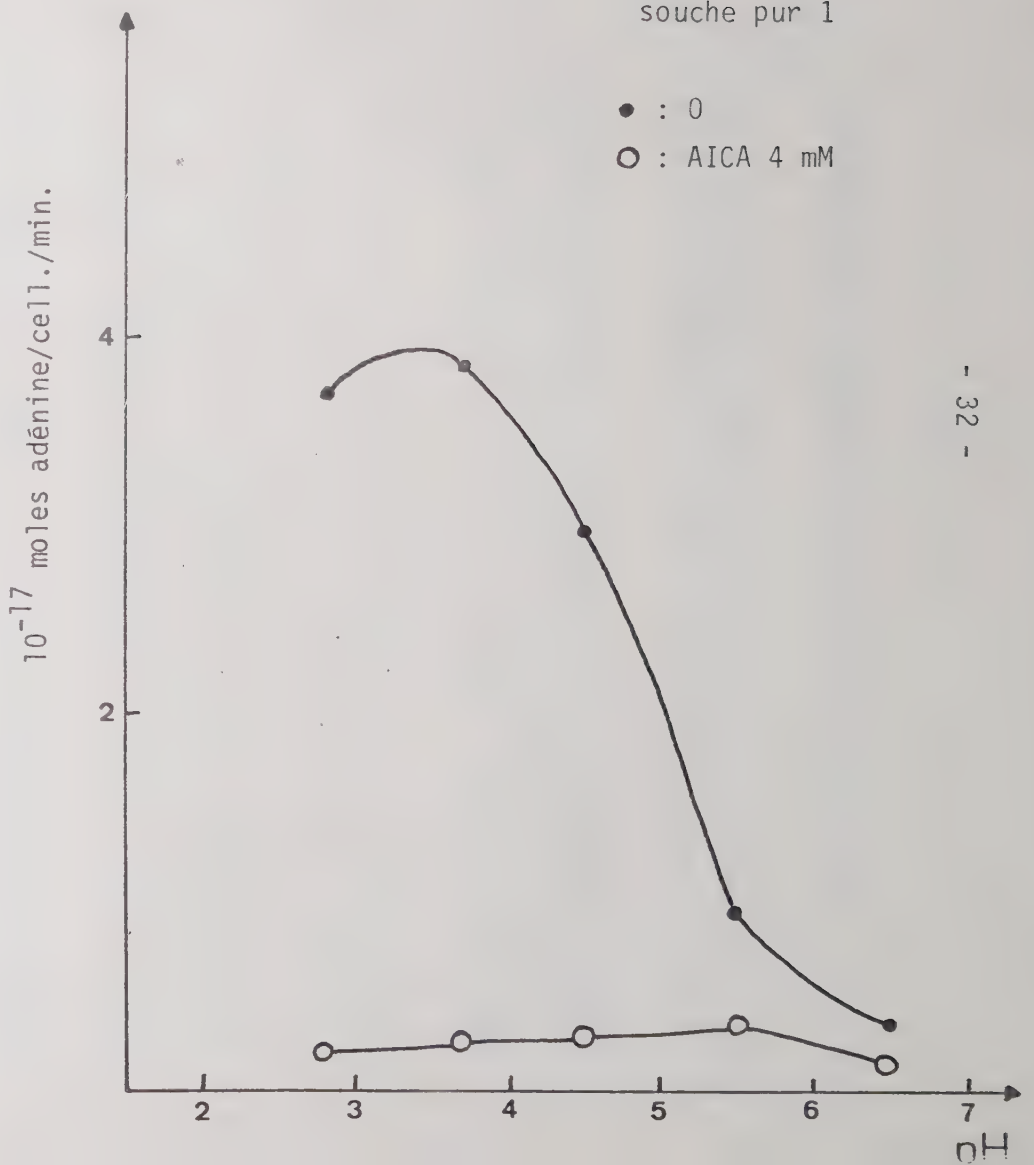
Les valeurs des Vmax pour les souches pur 1 et pur 1 dap1 notamment, semblent nettement inférieures à celles obtenues pour la souche sauvage, sur les deux milieux. Ces valeurs du Vmax, d'ailleurs, sont identiques pour chaque souche sur milieu pauvre en ammonium et sur milieu riche en ammonium.

Cependant, il serait présomptueux de vouloir tirer trop de conclusions précises et définitives de ce tableau. Nous pourrions le résumer en notant que deux groupes de valeurs de Km apparaissent : un groupe de Km autour de 2-2,5 μM pour les souches pur 1 et pur 1 dap1, et un groupe de km autour de 0,6 - 1 μM pour les souches sauvages et gup1. La valeur plus élevée du Km de gup 1 sur milieu MMA N5000 pourrait correspondre chez cette souche à l'existence d'une perméase sensible à l'ammonium.

FIGURE 3 ET FIGURE 4

EFFET DE L'AICA SUR "L'UPTAKE" D'ADENINE DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DE pur 1 CULTIVEES EN MILIEU MMA N5000.





II - DEPENDANCE DE L"UPTAKE" VIS A VIS DU pH DU MELANGE D'INCUBATION

Si nous revenons aux courbes 1 et 2, elles nous montrent nettement l'influence du pH sur la capacité "d'uptake" des cellules pour les bases puriques.

"L'uptake" aussi bien de l'adénine que de la guanine est maximal entre pH 4 et pH 5 et chute rapidement pour des pH plus élevés jusqu'à atteindre une valeur négligeable à pH 7. Ce phénomène est observable pour toutes les souches.

Cependant, comme le montrent les figures 3 et 4, la dépendance de "l'uptake" vis à vis du pH en présence d'inhibiteur est très différente pour la souche sauvage et le mutant pur 1 :

- L'AICA (5 amino 4 carboxamide imidazole) réduit de 50 % l"uptake" d'adénine de la souche sauvage entre pH 2,8 et pH 6 (figure 3).
- L'inhibition de "l'uptake" par l'AICA est totale à toutes les valeurs du pH pour la souche pur 1 (figure 4).

Il semble donc que si toute les souches de S. Pombe ont le même comportement vis à vis des variations du pH pendant "l'uptake", la souche pur 1 ne se comporte plus comme la souche sauvage en présence d'inhibiteur.

III - DEPENDANCE DE "L'UPTAKE" DE GUANINE ET D'ADENINE VIS A VIS DES INHIBITEURS DES PRTs ET VIS A VIS DU PRPP.

Il était intéressant de voir si les inhibiteurs des PRTs pouvaient éventuellement affecter également "l'uptake", fournissant ainsi un argument de plus en faveur de l'intervention de ces enzymes dans la perméation des bases puriques. Dela même façon, on pouvait envisager une action stimulatrice possible du PRPP,substrat des PRTs, sur "l'uptake" des bases. Notons que chez E.Coli, Hochstadt-Ozer a obtenu des réponses positives à ces deux questions en travaillant sur des cellules entières.(24)

En ce qui concerne la levure S. Pombe, nous n'avons pu mettre en évidence d'inhibition nette, même à des concentrations très élevées, que ce soit pour les nucléotides puriques ou pyrimidiques. De même, le PRPP a une concentration de 5 mM dans le milieu d'incubation, ne stimule ni "l'uptake" de guanine, ni celui d'adénine. On peut penser que le PRPP, comme les nucléotides, ne sont pas aptes à franchir la barrière que constitue la paroi de la levure.

En conclusion, il apparait tout d'abord clairement que les mutants affectés au niveau d'une ou des deux PRTs, c'est à dire pur 1, dap 1, et pur 1 dap1, présentent un "uptake" affecté au moins au niveau de la base libre correspondante, si ce n'est au niveau des "uptakes" des deux bases puriques.

La capacité des cellules à accumuler les bases puriques exogènes dépend de deux facteurs au moins : le pH du milieu d'incubation et la teneur en ammonium du milieu de culture.

Nous pouvons déjà dire que contrairement à la souche sauvage et la souche dap 1, les souches pur 1 et gup 1 présentent un "uptake" de la guanine et de l'adénine sensible à la concentration en ammonium du milieu. Il semble même que gup 1 ait une perméase de la guanine sensible à l'ammonium.

Si nous observons la même dépendance vis à vis du pH pour toutes les souches, il y a par contre une différence de sensibilité vis à vis des inhibiteurs de l"uptake" entre la souche sauvage et pur 1. Cette différence de sensibilité reste difficile à interpréter pour le moment. Il n'en reste pas moins que nous pouvons remarquer les répercussions importantes au niveau de "l'uptake" qu'engendre la déficience en phosphoribosyltransferase.

QUELQUES PROPRIETES DES PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES ET DE LA PRPP SYNTHETASE DE S. POMBE

A) LES PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES.

Dans la mesure où nous considérions que les PRTs étaient directement impliquées dans "l'uptake" des purines chez S. Pombe, nous pouvions envisager l'existence possible d'une"forme membranaire" de la phosphoribosyltransferase. Dans ce chapitre, nous avons rassemblé les différentes techniques utilisées pour essayer de mettre en évidence, de façon plus ou moins fructueuse, une activité enzymatique des PRTs liée à la membrane plasmique de la levure.

1) Mise en évidence d'une hétérogénéïté de L'APRT et de la GPRT.

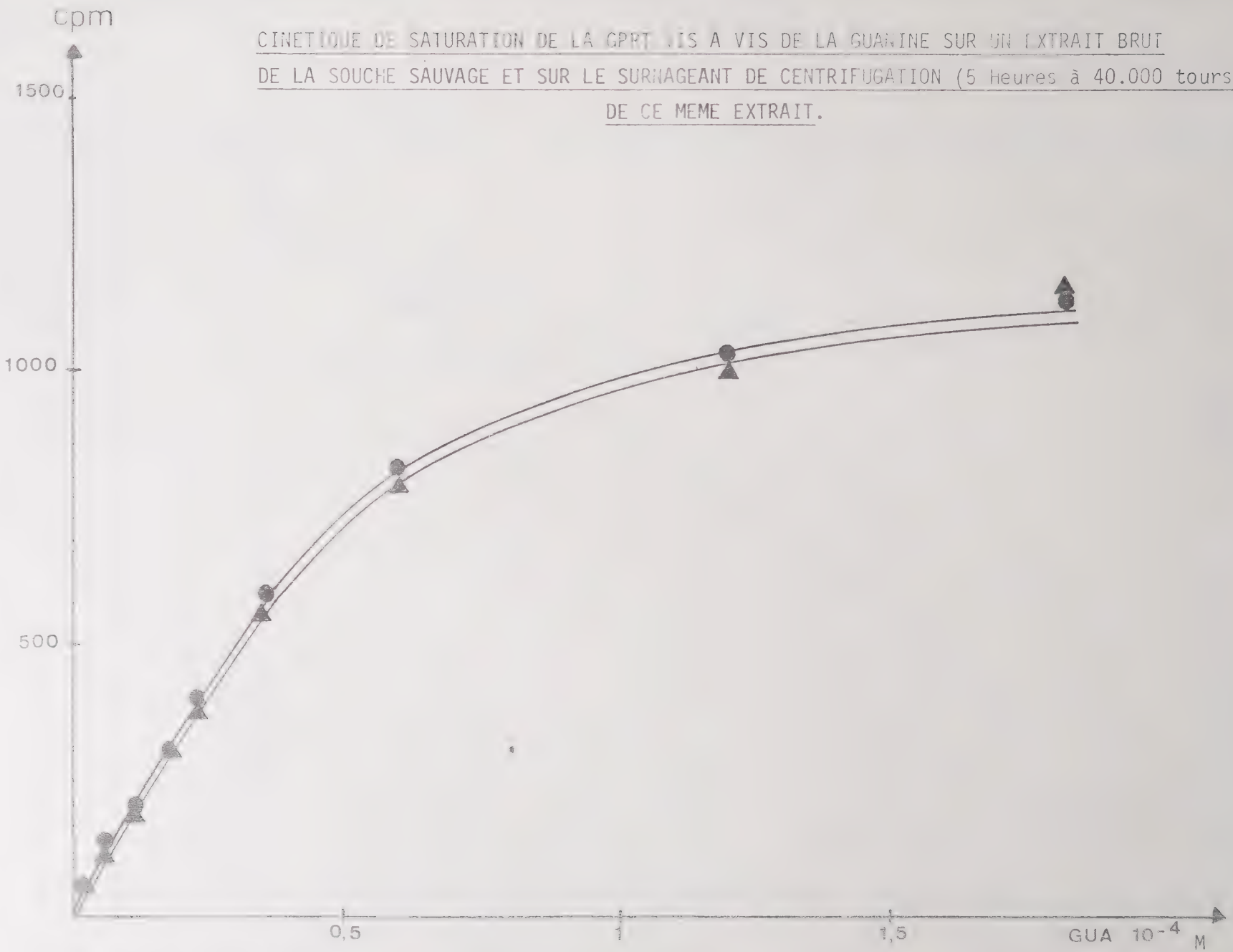
En 1974, M. Nagy, au cours d'une étape de purification des PRTs, a mis en évidence deux pics d'activité pour l'APRT et la GPRT . Ces deux pics étaient obtenus de façon reproductible après passage des extraits sur colonne de chromatographie CPG-10 ("controlled pore glass"). Ce même auteur a mis en évidence, au niveau des extraits bruts, plusieurs pics d'activité en fonction du pH.(44). Le même résultat a été obtenu chez E. Coli pour l'APRT.

Après une centrifugation de 5 heures à 40.000tr/min. d'un extrait brut de la souche sauvage, nous avons mis en évidence de façon reproductible de 10 à 15 % d'activité APRT et GPRT, selon les expériences, dans le culot de centrifugation. Ce faible pourcentage d'activité, exprimé par rapport à l'activité globale de chaque PRT dans l'extrait brut non centrifugé, pouvait correspondre soit à une contamination, soit à la présence dans le culot d'un organite cellulaire auquel les deux enzymes seraient attachés.

A l'époque, ces différents faits avaient été interprétés dansle sens de l'existence possible de plusieurs formes de PRTs correspondant à différentes localisations des enzymes dans lacellule : par exemple,une forme"cytosoluble" et une forme "membranaire" intervenant dans "l'uptake" des bases puriques.

Notons que l'éventualité de l'existence de deux formes de GPRT, codées par deux gènes différents,avait été écartée par le fait que le mutant pur 1 ne présentait aucune activité GPRT aussi bien au niveau du surnageant de l'extrait brut qu'au niveau du culot de centrifugation de ce même extrait.

CINETIQUE DE SATURATION DE LA GPRT VIS A VIS DE LA GUANINE SUR UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE ET SUR LE SURNAGEANT DE CENTRIFUGATION (5 Heures à 40.000 tours/min.) DE CE MEME EXTRAIT.



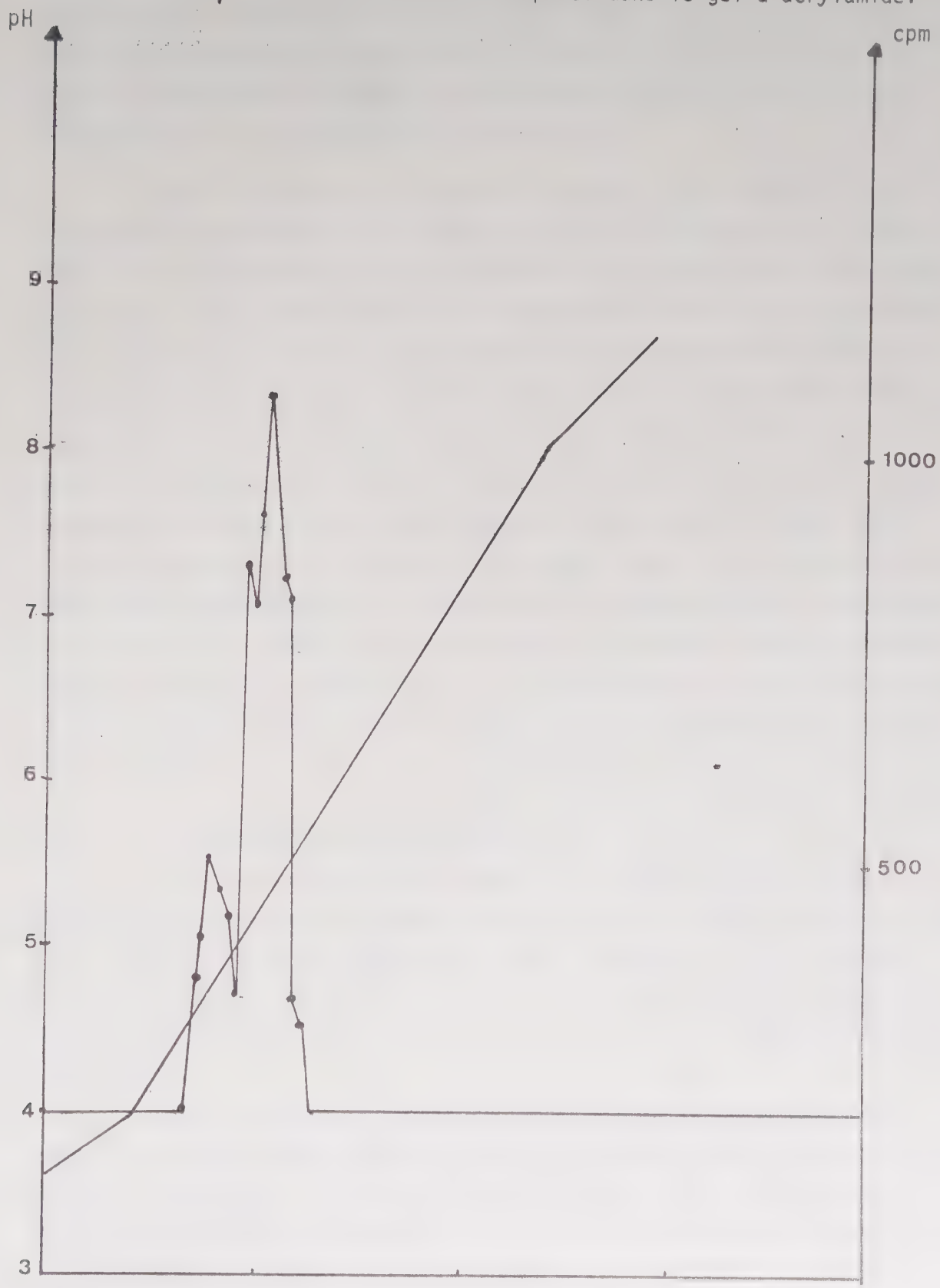
▲ : extrait brut

● : surnageant de centrifugation de l'extrait brut.

FIGURE 9

FOCALISATION ISOELECTRIQUE DE LA GPRT ISSUE DE L'EXTRAIT BRUT DE dap 1.

- Croissance des cellules en milieu YEA.
- 100 µl d'extrait brut sont déposés dans le gel d'acrylamide.



Les 20 cm de gel d'acrylamide sont découpés en tranches de 2mm de large. L'activité GPRT est testée dans chaque tranche comme indiqué dans le chapitre "matériel et méthodes".

Pour en savoir plus, nous avons profité d'un stage dans le Laboratoire du Docteur Reichert à Berlin,durant juin-juillet 1974, pour utiliser différentes techniques biochimiques,mises à notre disposition afin d'essayer de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus à Paris. Ces méthodes étaient principalement l'électrophorèse sur gel d'acrylamide et la focalisation isoélectrique.

Avant d'utiliser ces nouvelles méthodes, nous avons fait les cinétiques de saturation de la GPRT vis à vis de la guanine sur l'extrait brut et sur le surnageant de centrifugation de ce même extrait brut après 5 heures à 40.000 tours/minute. Cette expérience pouvait être une première tentative de différenciation des deux formes enzymatiques de la GPRT par la mise en évidence d'une différence de Km vis à vis de la guanine dans les deux extraits. En effet, si l'extrait brut pouvait contenir les deux formes de l'enzyme, le surnageant de l'extrait n'aurait dû avoir que la forme cytosolublé de la phosphoribosyltransferase. Malheureusement, comme le montre la figure 8, les deux courbes de saturation de la GPRT vis à vis de la guanine sont strictement superposées. Cela peut signifier que les deux formes hypothétiques de l'enzyme ont les mêmes constantes cinétiques,ou encore, que dans l'extrait brut comme dans le surnageant de centrifugation, les deux formes sont présentes : la forme membranaire pouvant être presque totalement détachée des membranes durant la centrifugation de l'extrait brut ou le broyage des cellules.

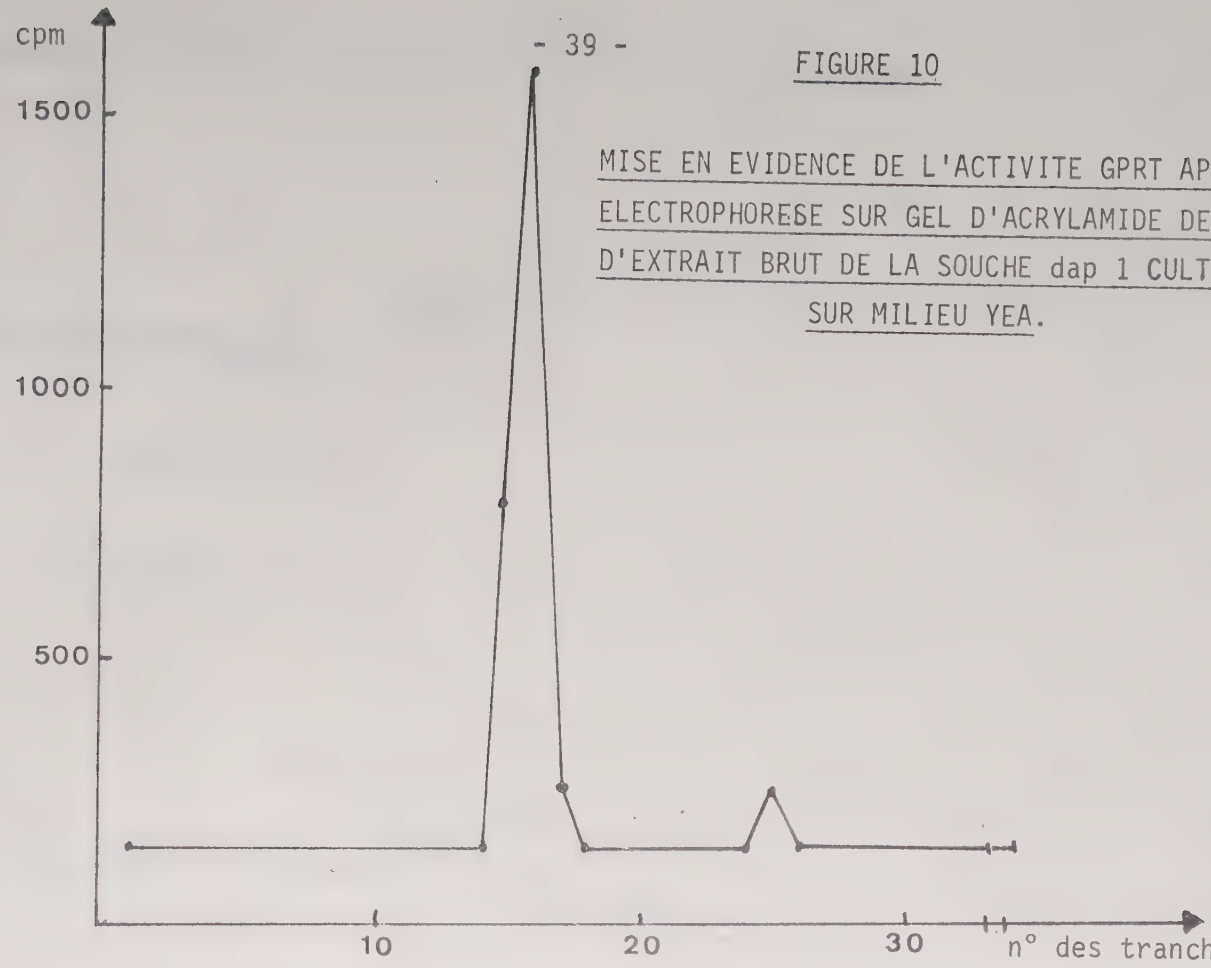
2) Focalisation isoélectrique.

En ce qui concerne cette méthode et l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, nous avons uniquement étudié l'activité GPRT issue de la souche dap 1 : en effet nous possédions à l'époque des résultats plus nombreux sur cet enzyme que sur L'APRT. De plus, en extrayant la GPRT à partir de la souche dap 1,nous évitions toute contamination par l'adénine phosphoribosyltransferase.

Comme le montre la figure 9, l'activité catalytique de la GPRT issue d'un extrait brut, présente deux pics distincts lors d'une électrophorèse en présence d'un gradient de pH. Ces deux pics correspondent à des matériels protéïques ayant des points isoélectriques respectivement à pH 4,7 et pH 5,4.

FIGURE 10

MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE GPRT APRES ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE DE 50 µl D'EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE dap 1 CULTIVEE SUR MILIEU YEA.



Après électrophorèse, le gel est découpé en tranches de 2 mm d'épaisseur, et chacune d'elle est testée pour l'activité GPRT.

FIGURE 11

MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE GPRT APRES ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE DE 50 µl DU SURNAGEANT DE CENTRIFUGATION (5H-40.000tr/ DE L'EXTRAIT BRUT DE dap 1.

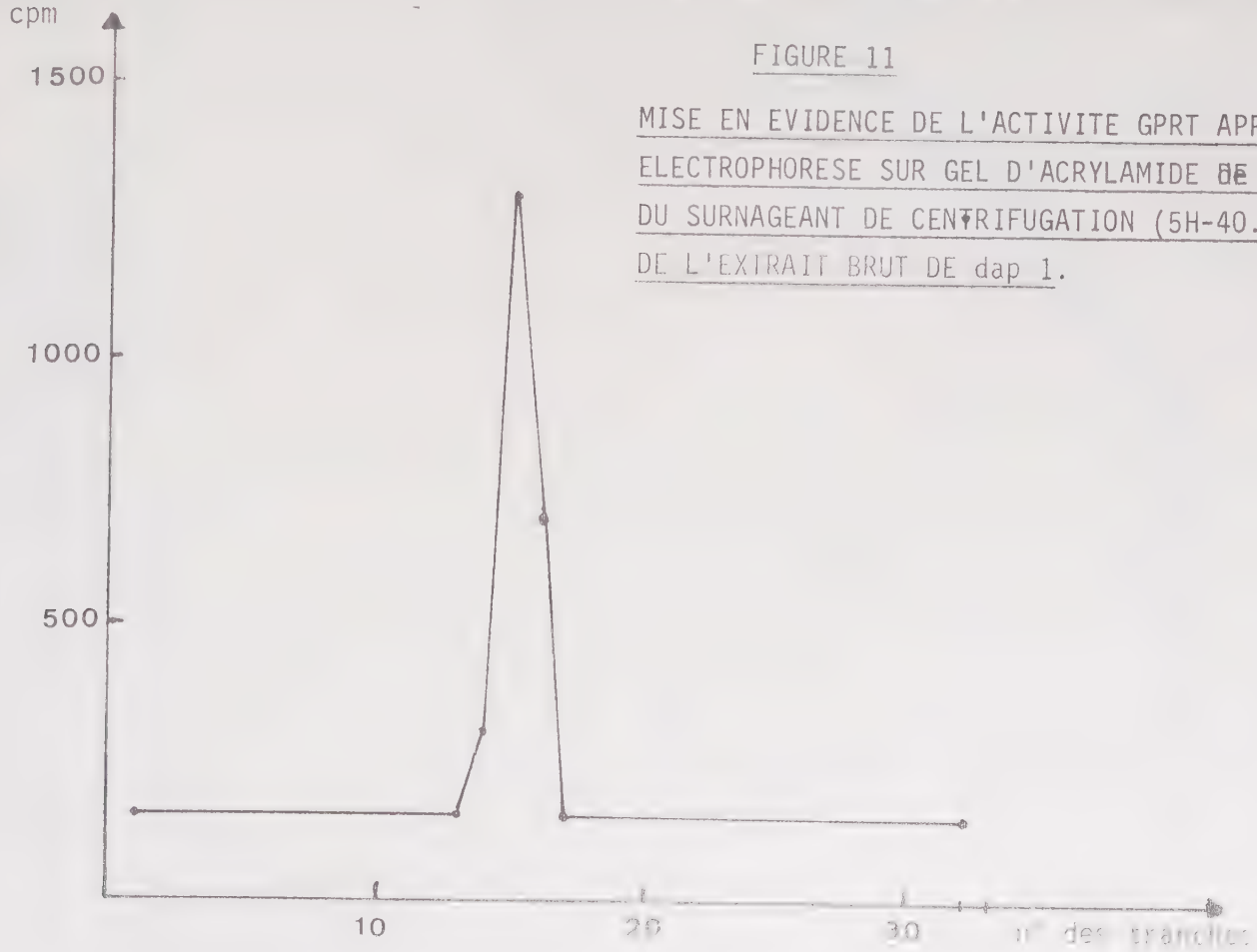


FIGURE 12

LECTURE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES PROTEINES DE L'EXTRAIT BRUT DE dap 1.

(Scanning de gel d'acrylamide à 570 nm).

- 10 µl d'extrait brut sont déposés en haut du gel,
- Les protéïnes à l'intérieur du gel, sont colorées par le bleu de Commassie brillant.

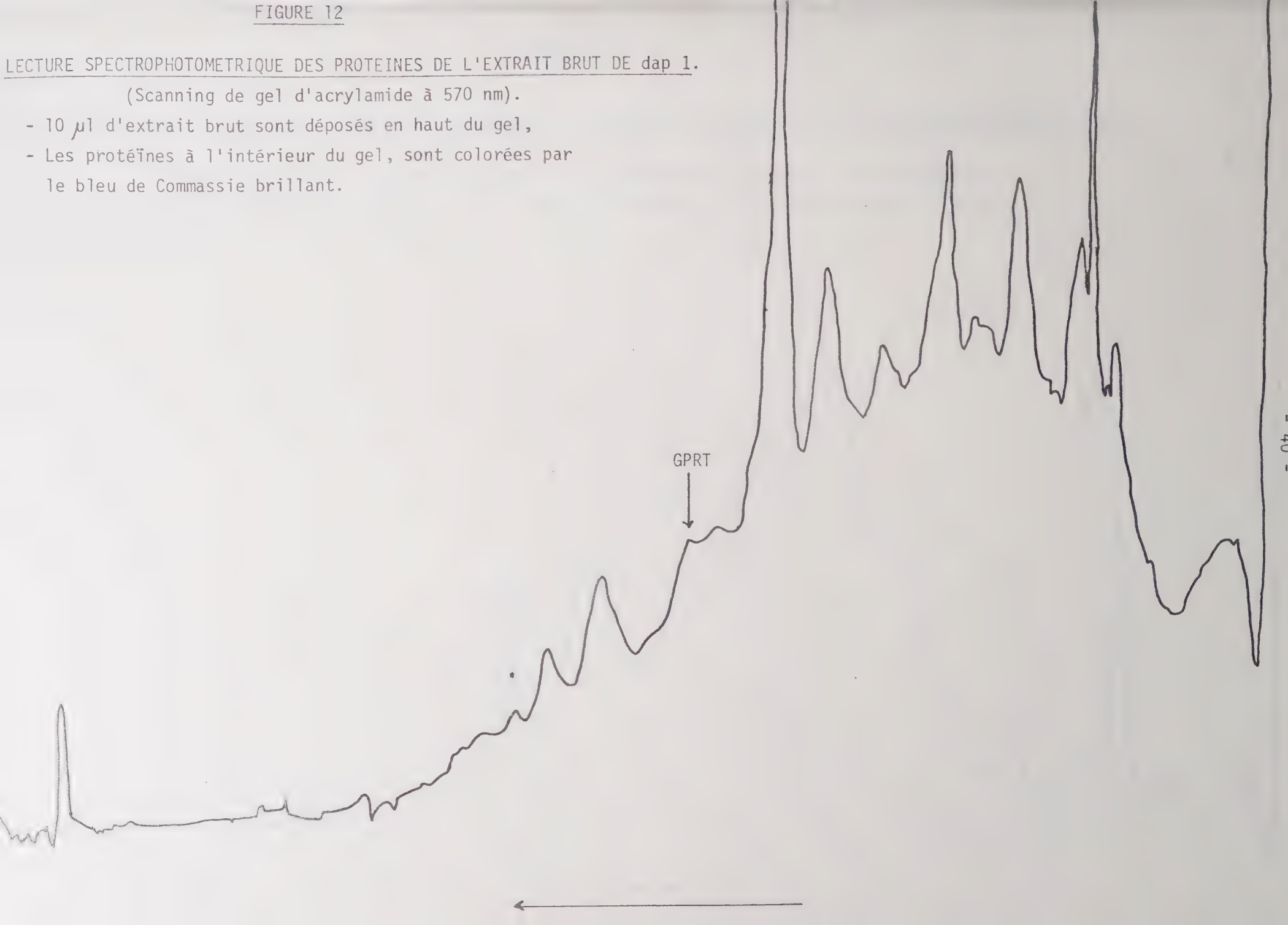


FIGURE 13

LECTURE SPECTROPHOTOMETRIQUE A 570 nm DES PROTEINES DU SURNAGEANT DE CENTRIFUGATION DE L'EXTRAIT BRUT DE dap 1.

- 10 µl de surnageant sont déposés sur le gel d'acrylamide en vue de l'électrophorèse.
- Les protéïnes, à l'intérieur du gel, sont colorées par le bleu de Comassie brillant.

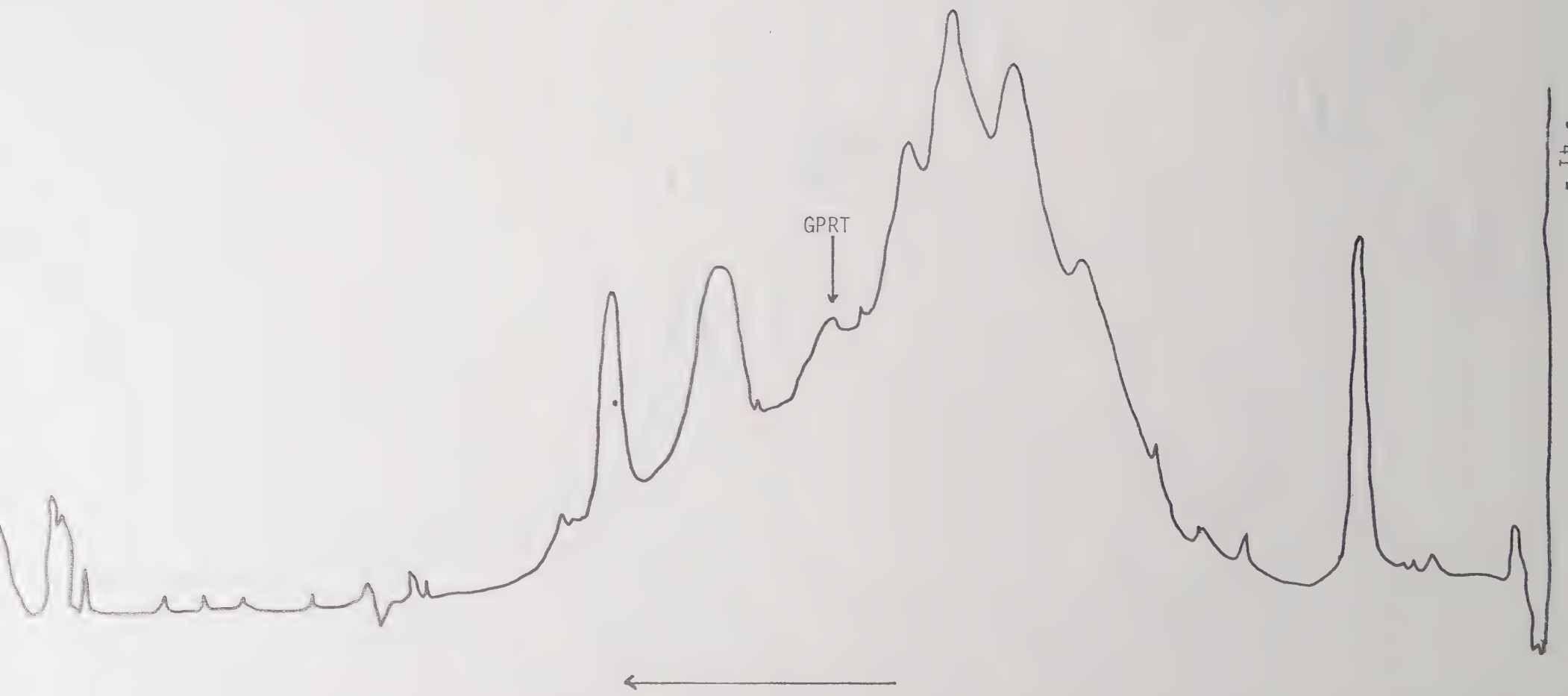
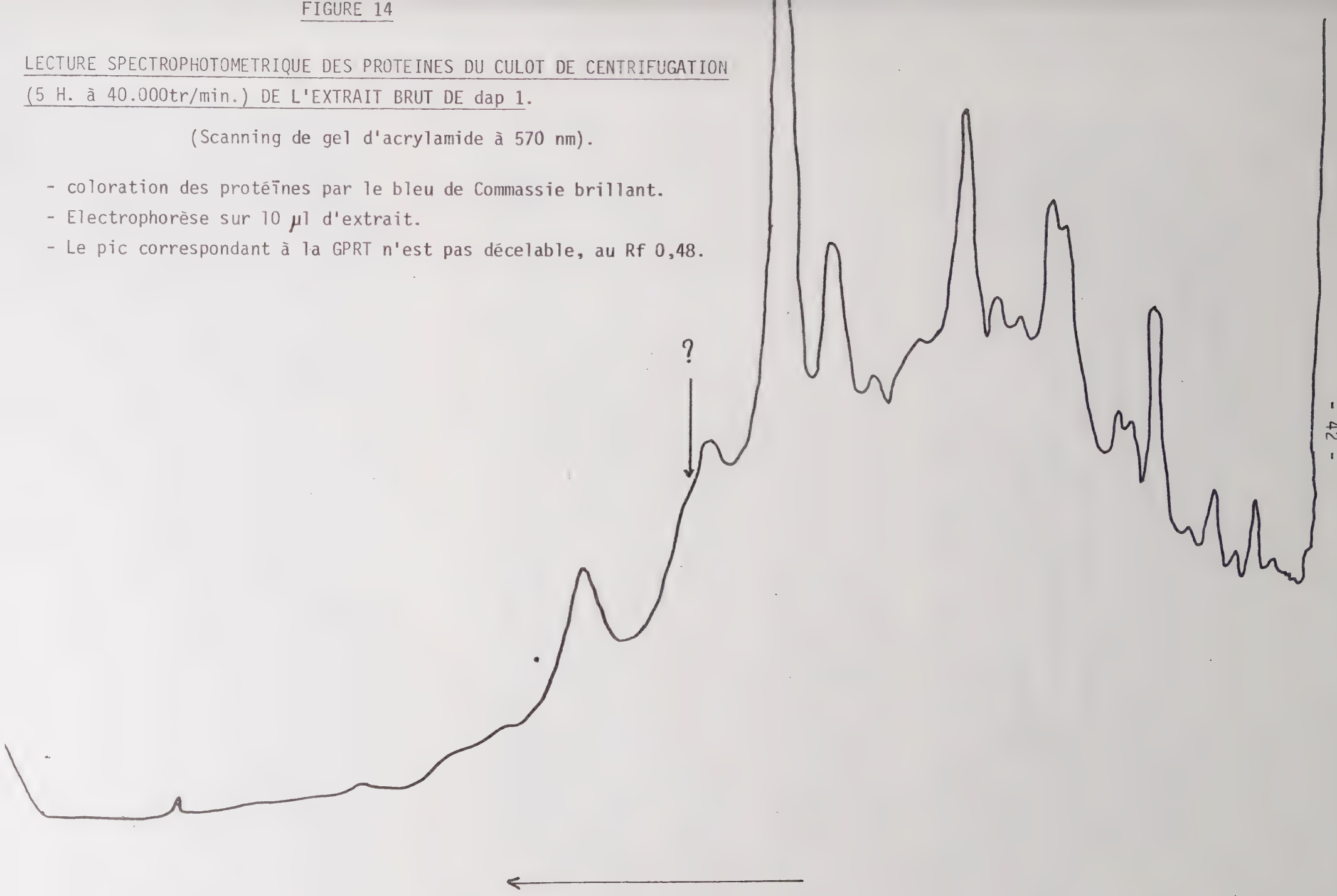


FIGURE 14

LECTURE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES PROTEINES DU CULOT DE CENTRIFUGATION (5 H. à 40.000tr/min.) DE L'EXTRAIT BRUT DE dap 1.

(Scanning de gel d'acrylamide à 570 nm).

- coloration des protéïnes par le bleu de Commassie brillant.
- Electrophorèse sur 10 µl d'extrait.
- Le pic correspondant à la GPRT n'est pas décelable, au Rf 0,48.



3) Electrophorèse sur gel d'acrylamide.

Les figures 10 et 11, correspondant respectivement à un extrait brut et à un surnageant de centrifugation à 50.000 tours pendant 5 Heures de ce même extrait, montrent des activités GPRT exactement au même emplacement sur le gel. La localisation des protéïnes par lecture spectrophotométrique à 570 nm de ces gels colorés au bleu de commassie (figures 12 et 13) nous permet de déterminer précisément le Rf de cette protéïne enzymatique : il est de 0,48. Le pic d'activité s'étendant en fait sur 6 mm de gel, nous pouvons penser à plusieurs pics confondus en un seul, compte tenu de la grossiéreté de la méthode de séparation comparée à la focalisation isoélectrique.

Notons que le culot de centrifugation de l'extrait ne présente plus d'activité GPRT (figure 14). Ceci ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas d'activité liée aux organites cellulaires ou aux fractions membranaires présentes dans ce culot : la protéïne a pu être détachée au cours des manipulations antérieures.

Notons enfin, qu'après un choc osmotique en présence de KCl, les cellules soumises à l'action d'un agent chaotropique,tel que le perchlorate de sodium,ne libèrent qu'une très faible quantité d'APRT et de GPRT.
On peut penser que si il existe une forme membranaire des PRTs, cette forme est peut-êtrepeu accessible et probablement pas périplasmique.Nous verrons dans le chapitre 6,que l'étude de "l'uptake" des bases par les protoplastes de S. Pombe nous permettra d'écarter plus catégoriquement l'hypothèse de l'existence d'un élément du transport localisé dans l'espace périplasmique.

La série de résultats exposés dans ce chapitre ne nous permet absolument pas de conclure à l'existence ou à la non existence d'une phosphoribosyltransferase associée à la membrane plasmique. En effet, si la chromatographie sur colonne SPG-10 et la focalisation isoélectrique révèlent deux pics d'activité pour la GPRT qui pourraient correspondre chacun à une forme enzymatique localisée à deux endroits distincts dans la cellule, l'électrophorèse sur gel d'acylamide ne met en évidence qu'un pic d'activité pour la GPRT et un choc osmotique violent sur des cellules entières ne libère pratiquement aucune activité dans le surnageant.

Nous ne pouvons pas écarter la possibilité que les deux pics d'activité de l'enzyme puissent correspondre à différents stades de dissociation d'une même protéïne polymérique et non pas à différentes localisations de la phosphoribosyltransferase dans la cellule.

Nous verrons dans le chapitre 7 que grâce à la mise au point d'une méthode d'obtention des protoplastes, nous pourrons envisager une autre approche pour essayer de mettre en évidence une activité au niveau de la membrane plasmique : il s'agit du dosage direct de l'activité PRT dans une préparation de fragments membranaires de S. Pombe.

B) LA PRPP SYNTHETASE.

Ce paragraphe ne prétend aucunement à une étude enzymologique exhaustive de la PRPP synthétase. Il s'agit seulement de passer en revue quelques propriétés de l'enzyme responsable de la synthèse du PRPP, substrat des PRTs, avant d'aborder dans le chapitre suivant les variations d'activité spécifique de la PRPP synthétase au cours de la croissance de la levure.

Rappelons que la méthode de dosage se déroule en deux temps :

R-5-P + ATP $\longrightarrow$ PRPP + AMP

PRPP + 14C acide orotique $\longrightarrow$ 14C OMP + PP

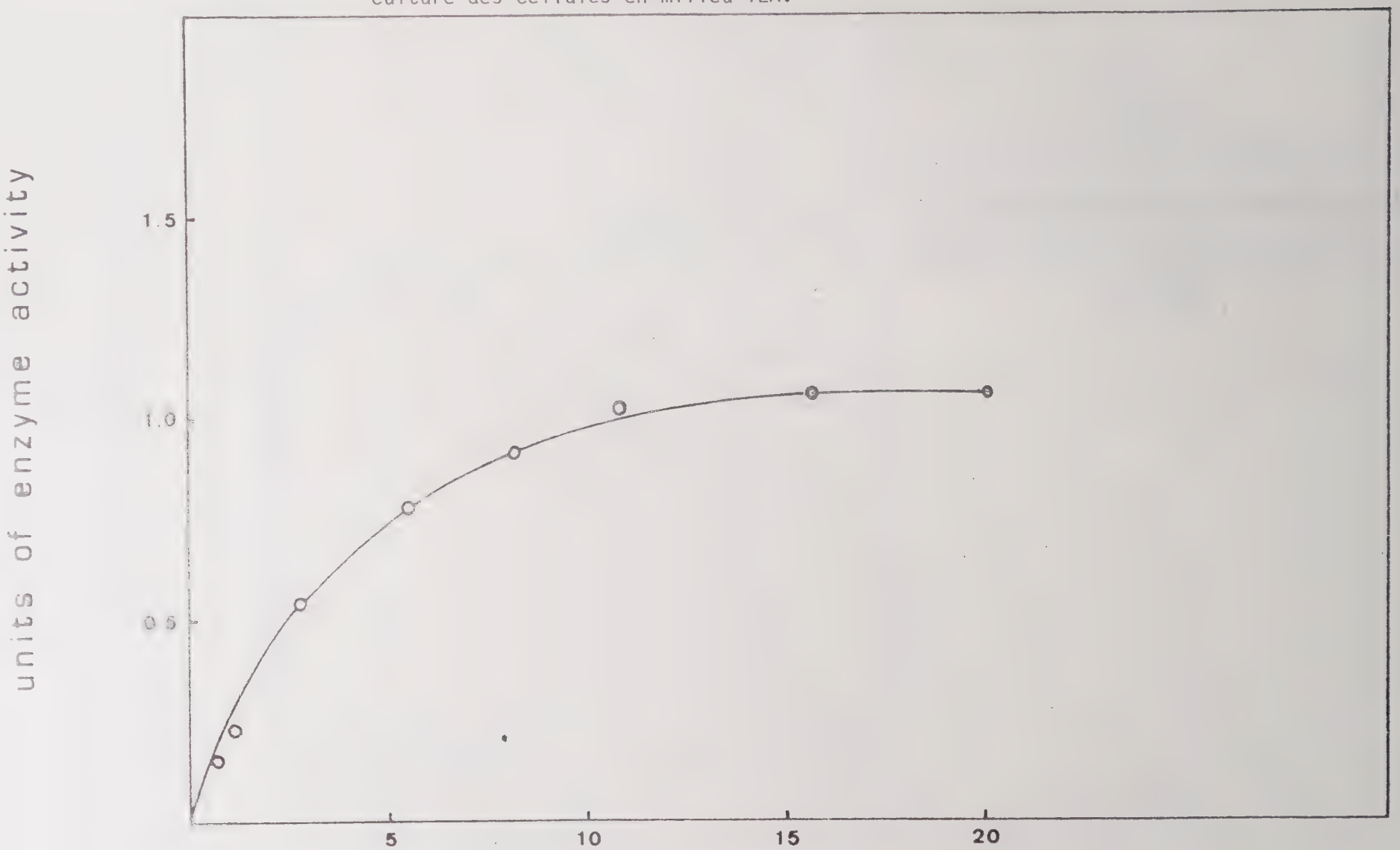
L'activité est donc dosée à l'aide d'une préparation commerciale d'orotate phosphoribosyltransferase qui convertitl'acide orotique radioactif et le PRPP synthétisé en OMP radioactif.(41)

1) Essai de conservation de l'enzyme.

L'extrait brut dialysé présente une activité spécifique de la PRPP synthétase inchangée pendant 24 Heures à 4°C. La "fraction PEG" présente une activité inchangée, pendant un minimum de 3 semaines, à la même température. L'addition de fluorure de sodium, inhibiteur des phosphatases, ne modifie pas l'activité de l'enzyme. En absence de dithiothreitrol pendant l'extraction, l'activité de l'enzyme est réduite de 60 %. Quand le glutathion réduit est omis de la mixture d'incubation, l'activité mesurée est à 70 % de sa valeur normale.

EFFET DE LA CONCENTRATION EN $MgCl_2$ SUR L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PRPP SYNTHETASE DE LA SOUCHE SAUVAGE DE S. POMBE

culture des cellules en milieu YEA.



1 unité d'activité enzymatique = 10^{-8} moles de PRPP synthétisé/mg de protéïne /minute.

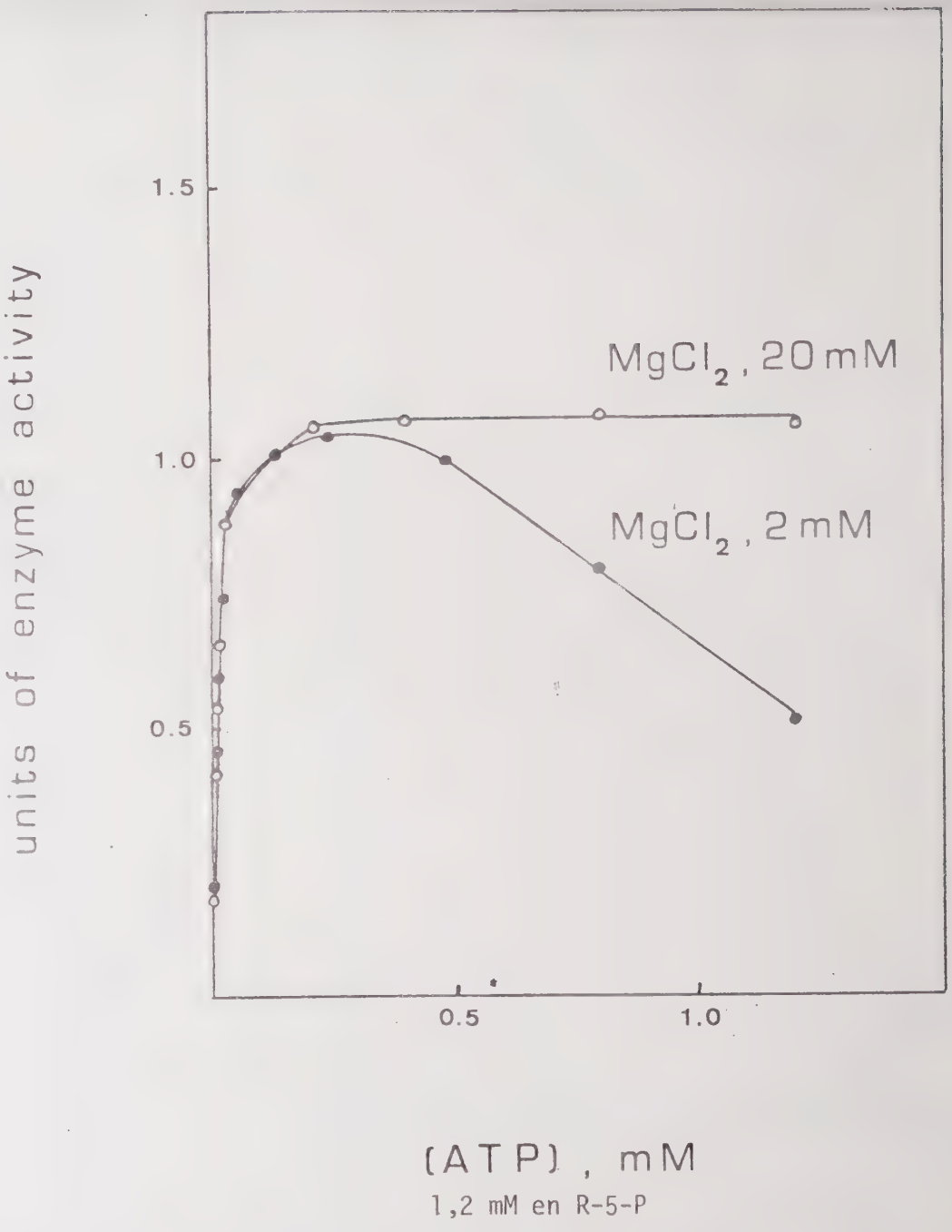


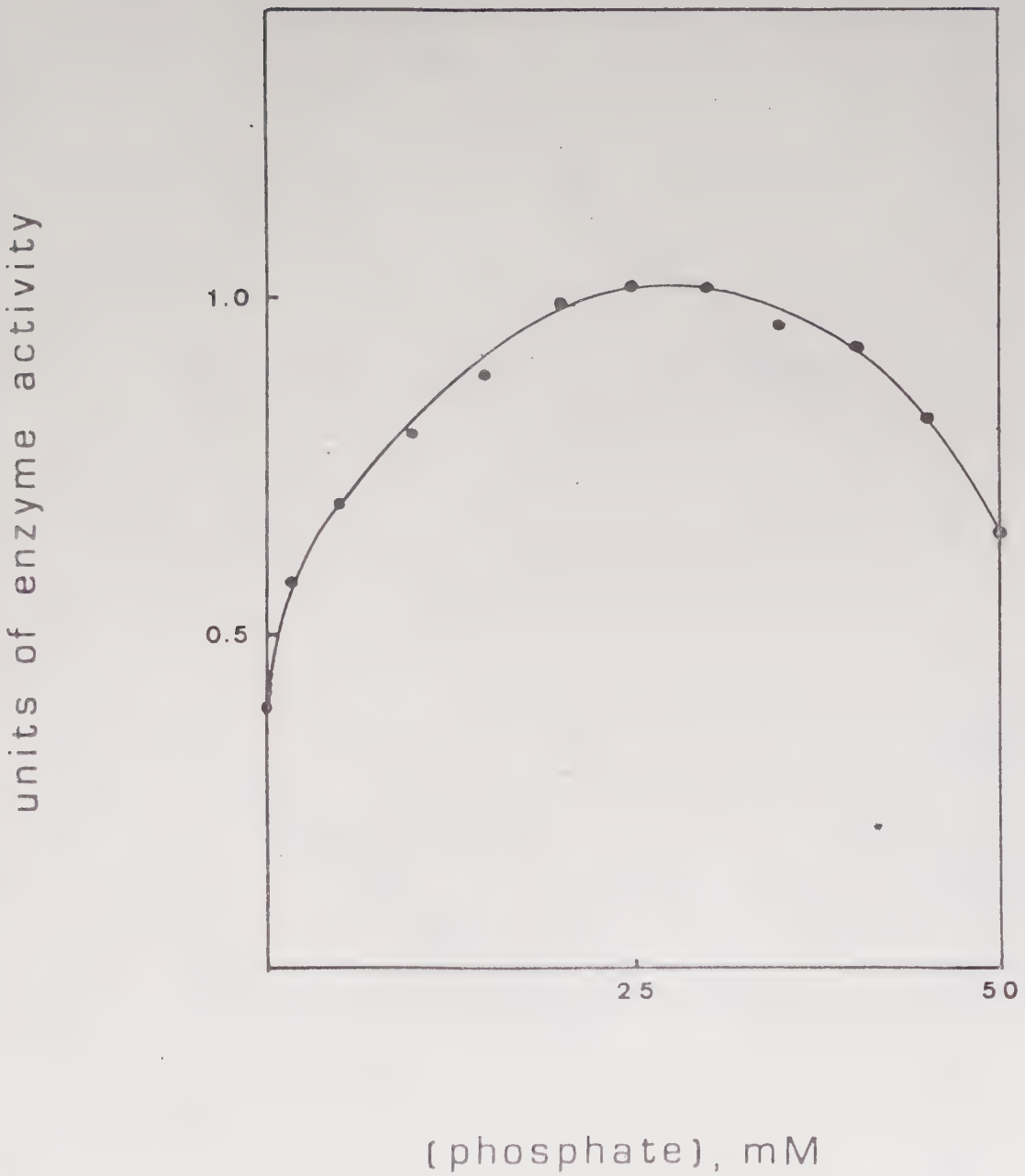
FIGURE 16

EFFET DE LA CONCENTRATION EN IONS MAGNESIUM DANS L'INCUBATION SUR LES COURBES DE SATURATION DE L'ACTIVITE PRPP SYNTHETASE VIS A VIS DE L'ATP

1 unité d'activité enzymatique = 10^{-8} moles de PRPP synthétisé par mg de protéïne et par minute.

FIGURE 17

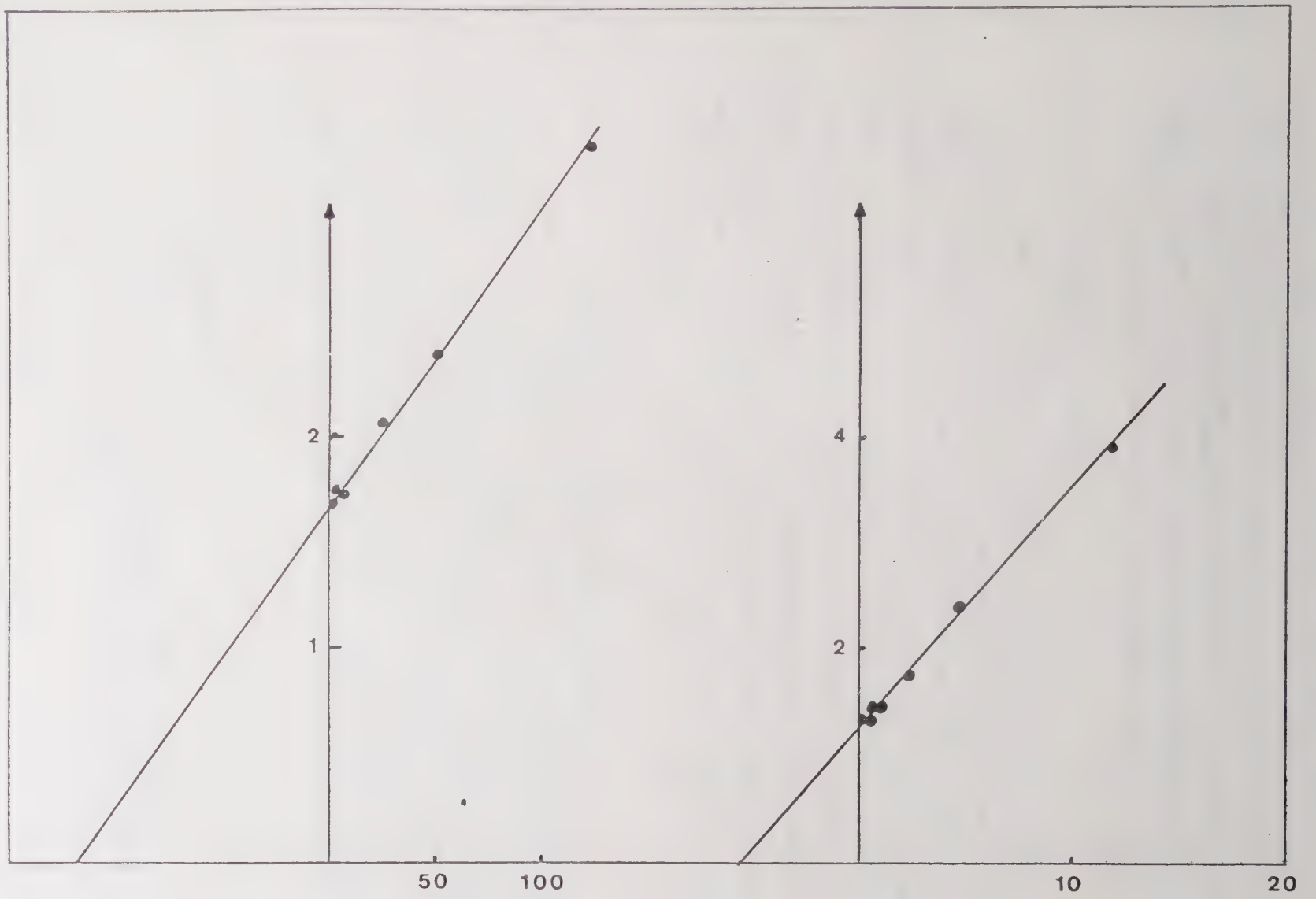
ACTIVATION DE L'ACTIVITE PRPP SYNTHETASE PAR LES IONS PHOSPHATE PRESENTS DANS LE MILIEU D'INCUBATION.



Les conditions "standard" du dosage enzymatique sont utilisées, excepté pour la concentration en phosphate de potassium qui est celle indiquée sur la figure.

1 unité d'activité enzymatique correspond à 10^{-8} moles de PRPP synthétisé par mg de protéïne et par minute.

REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK DE L'ACTIVITE PRPP SYNTHETASE VIS A VIS DU R-5-P ET DE L'ATP.



$1/v$ (cpd/min)$^{-1}$

$1 / (ATP)$, mM^{-1}

1,2 mM en R-5-P

$1 / (R\text{-}5\text{-}P)$, mM^{-1}

0,32 mM en ATP

Concentrations respectives en $MgCl_2$ et en ions phosphate dans l'incubation : 20 mM et 30 mM.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Roth et Flaks (49, 50). Le fait que le dithiothreitrol et le glutathion réduit soient indispensables pour une activité maximale de l'enzyme, peut indiquer que ce dernier possède des groupes sulfhydryles qui interviennent dans l'obtention d'une activité optimale. Notons que Switzer a mis en évidence, chez Salmonella Typhimurium, une PRPP synthétase inhibable par les composés-SH.(51)

2) Besoin en ions Mg^{++}.

Comme le montrent les figures 15 et 16, la PRPP synthétase de S. Pombe a un besoin absolu envers ce cation divalent, comme d'ailleurs d'autres auteurs l'ont observé chez les plantes (52), les cellules de mammifères (53,54) et les bactéries (55). Ces auteurs suggèrent que le substrat réel de l'enzyme est le complexe Mg^{++}- ATP et que de plus, des ions Mg^{++} libres sont indispensables à une activité maximale. La figure 16 d'ailleurs montre bien la nécessité d'une concentration en Mg^{++} supérieure à celle de l'ATP pour atteindre l'activité maximale chez S. Pombe. On peut aussi penser comme le suggère Switzer que le cation est nécessaire aussi au Ribose-5-phosphate qui serait substrat sous forme de Mg^{++} - R5P.(56).

3) Activation par le phosphate inorganique.

La PRPP synthétase est activée par la présence d'ions phosphate dans le mélange d'incubation (figure 17). L'activé maximale de l'enzyme est obtenue pour une concentration en phosphate de 32 mM dans l'incubation. Chez les cellules de mammifères, une valeur analogue a été rapportée par Roth(58) et la courbe obtenue pour notre organisme est identique à celle observée par Herschko chez des cellules d'ascites d'Ehrlich (60). Notons que cette valeur est beaucoup plus importante que celle observée pour la PRPP synthétase des bactéries (57).

4) Cinétiques.

En présence de concentrations optimales de phosphate et d'ions Mg^{++}, le Km apparent pour l'ATP est de 80 µM et pour le R-5-P de 190 µM.(figure 18).

TABLEAU IV

EFFETS DES DIFFERENTS NUCLEOTIDES SUR L'ACTIVITE DE LA PRPP SYNTHETASE

INHIBITEURS 0,5 mM	POURCENTAGE D'ACTIVITE RESIDUELLE
0	100
AMP	59,5
GMP	59
ADP	31
GDP	89
UMP	72
CMP	64
UDP	90
CDP	87

- Nous avons vérifié que l'orotate phosphoribosyltransferase était suffisamment présente en excès dans le mélange d'incubation pour que les inhibiteurs nucléotidiques,à la concentration de 0,5 mM, n'affectent pas l'activité de cet enzyme commercial.

- L'inhibition de l'activité PRPP synthétase par l'ADP est testée en l'absence du système de régénération de l'ATP présent habituellement dans le mélange d'incubation.

5) Inhibition par les nucléotides.

Le tableau IV résume les effets de quelques nucléotides puriques et pyrimidiques sur l'activité PRPP synthétase.

L'ADP, l'AMP et le GMP sont les inhibiteurs les plus efficaces. Les nucléotides puriques sont des inhibiteurs plus puissants que les pyrimidiques. Sauf pour l'ADP, les mononucléotides inhibent l'enzyme plus efficacement que les dinucléotides.

Le système de régénération de l'ATP dans le mélange d'incubation est supprimé lorsque l'inhibition par l'ADP est testée ; le contrôle, dans ce cas, n'a pas non plus de système de régénération.

On peut remarquer que l'enzyme issu de S. Pombe présente une sensibilité relativement basse envers ces inhibiteurs par rapport à l'enzyme issu de la bactérie (59). Il se pourrait que ces inhibiteurs agissent chez la levure de façon synergique sous forme d'un pool nucléotidique, comme l'ont déjà décrit Switzer et Sogin chez S. typhimurium (61). Nous n'avons pas testé cette hypothèse chez S. Pombe.

Cette courte revue de quelques propriétés de la PRPP synthétase de S.Pombe va nous permettre d'aborder dans le chapitre suivant, les variations d'activité de cet enzyme au cours de la croissance de la levure sur différents milieux et chez différentes souches, comme nous le ferons pour les PRTs , et de voir s'il existe un rapport entre les activités de ces enzymes et l'activité de "l'uptake" des bases puriques.

ARIATIONS DES ACTIVITES SPECIFIQUES DES PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES, DE LA PRPP SYNTHETASE ET DE "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES PENDANT LA CROISSANCE DE S. POMBE.

Il nous semblait important d'étudier parallèlement les évolutions au cours du temps du phénomène "d'uptake" des bases puriques et de les relier aux activités PRT et PRPP synthétase, pour éventuellement mettre en évidence une corrélation à ce niveau.

Nous avons vu, dans le chapitre "matériels et méthodes", que les cellules subissaient une première préculture, sur milieu YEA ou MMA, en milieu solide, suivie d'une deuxième préculture en milieu liquide pendant 48 Heures. Les cellules issues de cette deuxième préculture sont ensemencées à raison de 10^6 cellules par ml de milieu frais. Les prélèvements stériles des échantillons se font tout au long de cette dernière culture, à partir de la première génération cellulaire après l'ensemencement, jusqu'à l'obtention d'une phase stationnaire stable.

Ce mode opératoire présente deux avantages :

- 48 Heures de préculture liquide assure au moment de l'ensemencement une homogénéité relative du matériel cellulaire qui se trouve avoir été ainsi, pendant 24 Heures environ, en phase stationnaire. Nous pouvons espérer par ce procédé réaliser des ensemencements à peu près reproductibles.

- La préculture sur milieu liquide permet d'éviter une perturbation métabolique possible provoquée par le transfert direct des cellules du milieu solide au milieu liquide.

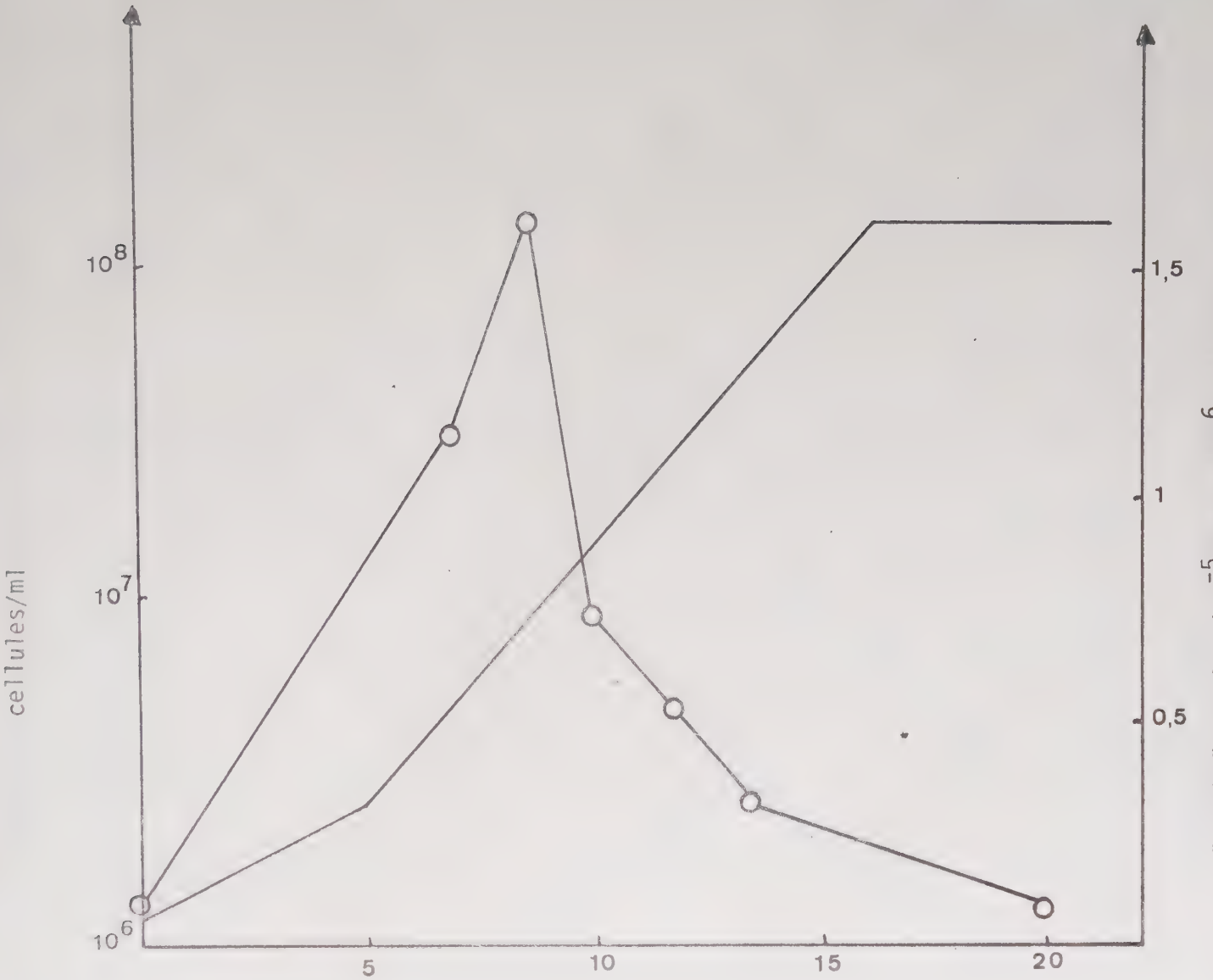
A-) LA SOUCHE SAUVAGE SUR MILIEU MINIMUM MMA (N5000) ET SUR MILIEU COMPLET YEA.

1) "L'Uptake" des bases puriques sur milieu MMA et YEA.

Comme l'indique la figure 19, la courbe d'"uptake" de la guanine en milieu YEA subit un accroissement pendant le début de la phase exponentielle et passe par un maximum correspondant à une population cellulaire de 10^7 cellules/ml, dans nos conditions de culture, c'est à dire trois générations environ après l'ensemencement.

FIGURE 19

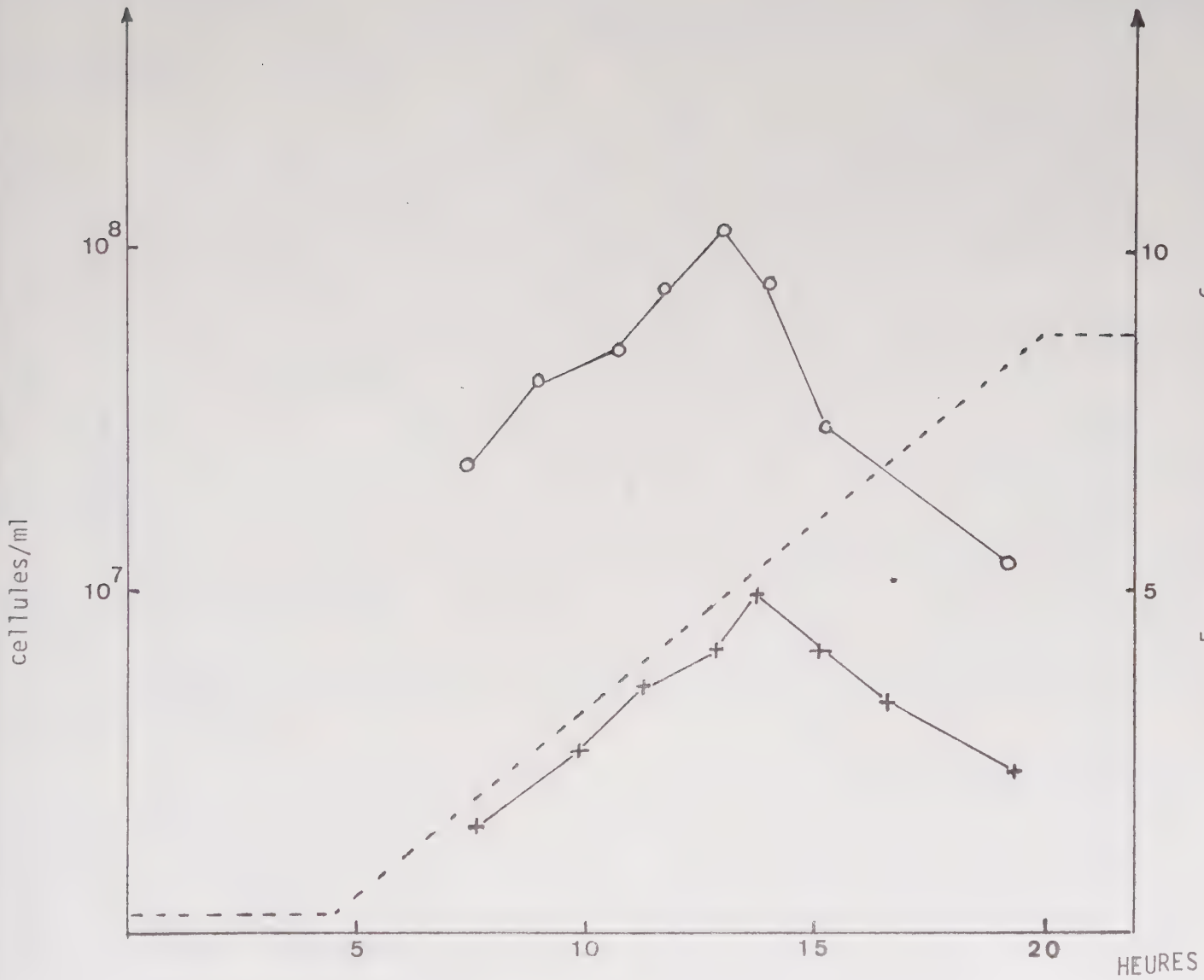
EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR "L'UPTAKE" DE GUANINE DANS UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE SUR MILIEU YEA.



Les échantillons de cellules sont prélevés aux temps indiqués sur la figure et l'activité perméasique est testée comme indiqué dans le chapitre "matériel et méthodes."

FIGURE 20

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE EN MILIEU MMA N5000 SUR "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES.



+ : "uptake" guanine o : "uptake" adénine

Les cellules sont prélevées aux temps indiqués sur la figure et "l'uptake" des bases puriques est mesuré immédiatement.

TABLEAU V

ACTIVITES PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASES ET PERMEASIQUES

DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE DE LA SOUCHE SAUVAGE DE S. POMBE.

CONDITIONS DE CULTURE	A-PRT coups/min/mg prot	G-PRT coups/min/mg prot.	"uptake" guanine 10^{-11} moles/10^6 cell/mi
lules cultivées en milieu MMA *	48	17	5,1
lules cultivées en milieu YEA *	75	26	1,6
lules cultivées en milieu MMA ndant 16 Heures.		14	4
lules cultivées en milieu MMA ndant 18 Heures.		11,8	2,6
lules cultivées en milieu MMA dant 24 Heures.		4	0,5
lules cultivées en milieu MMA dant 16 H. supplémenté en hypo-thine de 14 H. à 16 H.		13,5	4,5
lules cultivées en milieu MMA dant 18 H. supplémenté en hypo-thine de 14 H. à 18 H.		12,3	2,3
lules cultivées en milieu MMA dant 24 H. supplémenté en hypo-thine de 14 H. à 24 H.		2,6	0
lules cultivées en milieu + FPMS et broyées en présence FPMS *		27	
lules cultivées en milieu * et broyées en présence d'EDTA		25,3	

* : Lorsque les temps de culture ne sont pas indiqués, les cellules ont été récoltées au maximum d'activité PRT et "d'uptake", c'est à dire 14 Heures environ de culture sur YEA et 16 Heures sur MMA.

Sur la figure 20, la souche sauvage sur milieu MMA présente des variations au niveau des courbes "d'uptake" de la guanine et de l'adénine similaires à celles que l'on observe sur milieu YEA.

Cependant, le tableau V montre nettement que si les courbes "d'uptake" de guanine sur les deux milieux subissent les mêmes variations, la valeur du maximum de "l'uptake" sur le milieu MMA est environ trois fois plus élevée que celle sur le milieu YEA. Nous pouvons peut-être trouver une explication à cette différence entre les deux milieux de culture par la possibilité d'une dilution isotopique de la guanine radio-active par les bases puriques froides au moment de la mesure de "l'uptake" en milieu YEA.

En effet, si le milieu MMA est exempt de bases puriques, Reichert a montré que le milieu YEA, frais et autoclavé, était relativement riche en guanine, hypoxanthine, adénine et leurs nucléosides respectifs (environ 90 μM pour l'ensemble de ces corps). On peut alors aisément imaginer que la mise en présence, au moment de la mesure, de la guanine radio-active avec les cellules resuspendues dans du milieu YEA frais, riche en guanine froide, entraine une importante dilution isotopique de la guanine marquée au carbone 1

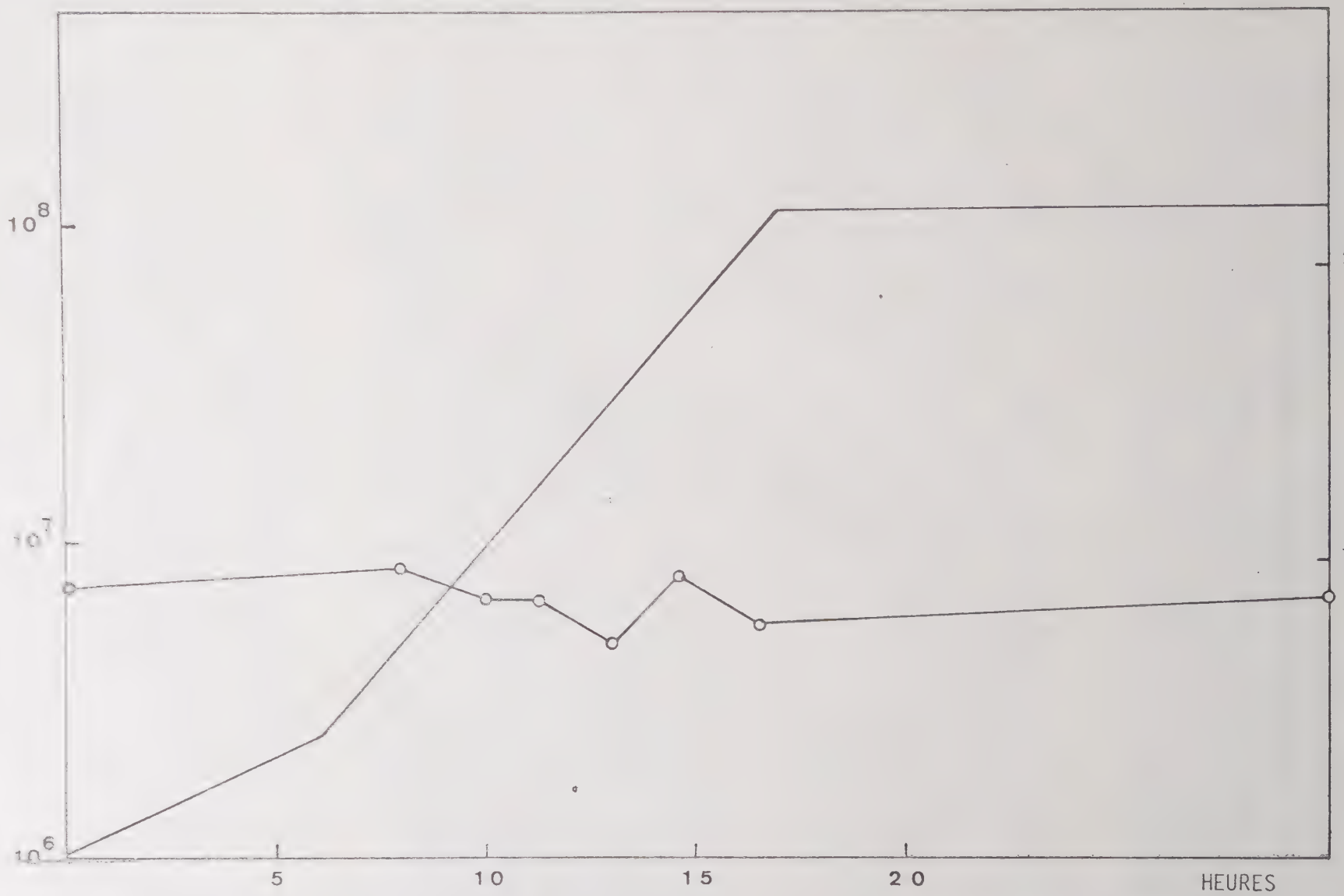
A ce phénomène de dilution isotopique de la guanine radio-active par la guanine froide présente dans le milieu frais YEA, s'ajoute le fait que les autres bases puriques présentes, telles que l'hypoxanthine et l'adénine inhibent compétitivement l'entrée de la $^{14}C_8$ guanine, comme l'a montré J. Pourquié., et accentuent ainsi la baisse d'entrée de la base sur milieu YEA.

Ces deux faits conjugués peuvent expliquer la valeur beaucoup moins importante de l"uptake" sur YEA par rapport au milieu MMA.

On peut également envisager, à côté de cette première explication de la différence dans les valeurs de maximas des courbes "d'uptake" de la guanine de la souche sauvage sur les deux milieux, que, sur milieu MMA, le pool intra-cellulaire de bases puriques est beaucoup moins élevé en début de phase exponentielle, après 48 Heures de préculture sur le même milieu, qu'il ne doit l'être sur milieu YEA. Cette valeur plus basse du pool sur MMA permet à la cellule d'atteindre une valeur du maximum d'activité perméasique plus élevée que sur YEA. Nous pourrions en quelque sorte être en présence d'une régulation de "l'uptake" de guanine par le pool intra-cellulaire des bases puriques.

FIGURE 21

VARIATIONS DE L'ACTIVITE PRPP SYNTHETASE PENDANT LA CROISSANCE DE LA SOUCHE SAUVAGE SUR MILIEU YEA.



Les cellules sont collectées aux temps indiqués et l'activité PRPP synthétase est testée.

1 unité d'activité enzymatique = 10^{-8} moles de PRPP synthétisé/mg protéïne/minute.

Dans le même ordre d'idée, nous avons cherché à savoir si nous ne pouvions pas intervenir sur la valeur du maximum de la variation d'activité de "l'uptake" de guanine, ou prolonger la période durant laquelle cet"uptake" était à sa valeur maximum en intervenant artificiellement sur le pool intracellulaire de bases puriques. La justification de cette manipulation vient du fait que la courbe de variation de l"uptake" suit très sensiblement la même courbe que celle obtenue par Nagy et Reichert,chez S. Pombe,pour les pools des nucléosides et des bases puriques libres au cours de la croissance de la levure.

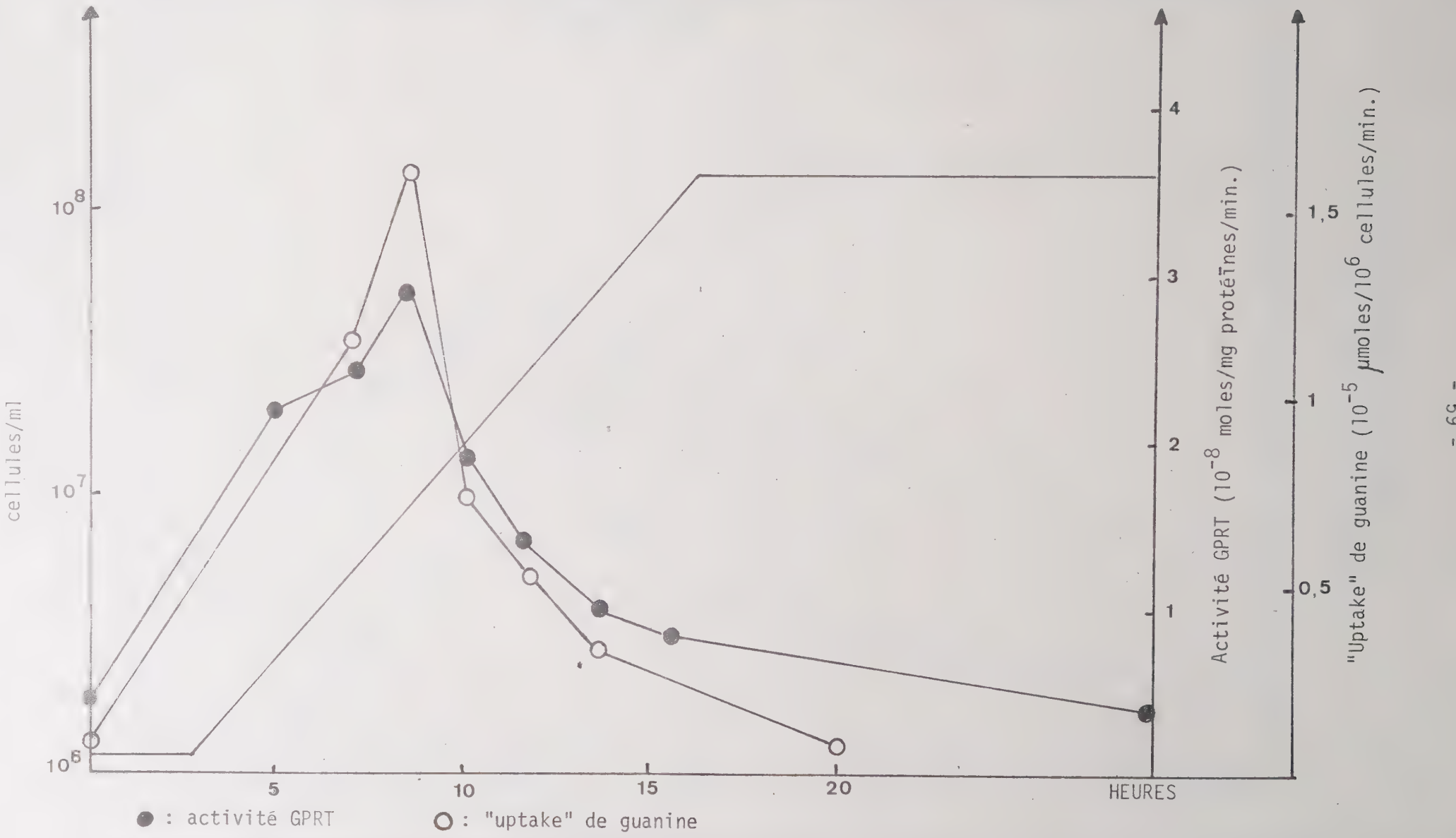
Dès lors, il semblait intéressant d'agir sur le pool des bases puriques en ajoutant de l'hypoxanthine au milieu MMA pendant la croissance de la souche sauvage. Nous avons choisi l'hypoxanthine pour sa meilleure solubilité en solution aqueuse, compte tenu que cette base purique utilise la même perméase que la guanine et qu'elle est également substrat de la GPRT. Nous avons donc ajouté l'hypoxanthine, à raison de 100 mg/litre de milieu MMA au niveau du maximum d'activité de"l"uptake" de guanine, c'est à dire 14 heures après l'ensemencement dansnos conditions de culture.

Nous avons prélevé des cellules à différents intervalles de temps après l'adjonction de la base purique et comparé leur capacité"d'uptake" avec des cellules cultivées pendant le même temps, mais n'ayant pas reçu d'hypoxanthine. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau V : l'addition d'hypoxanthine dans le milieu MMA est sans effet sur"l'uptake" de guanine de la souche sauvage, et l'on observe toujours, dans ces conditions, la chute d'activité perméasique après 14 Heures de culture. Nos conditions expérimentales n'ont pas permis d'identifier une base purique exogène comme élément responsable de la variation d'activité de"l'uptake" de guanine sur le milieu MMA.

2) La PRPP synthétase chez la souche sauvage.

Les variations d'activité de cet enzyme n'ont été mesurées à plusieurs reprises que sur le milieu YEA. Comme le montre la figure 21, l'activité spécifique de la PRPP synthétase ne varie pas au cours de la croissance.

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE GPRT ET SUR "L'UPTAKE" DE GUANINE DANS UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE SUR MILIEU YEA.



- Les échantillons de cellules sont prélevés aux temps indiqués sur la figure et testés pour les 2 activités enzymatiques.

FIGURE 23

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE GPRT DANS UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE SUR MILIEU YEA.

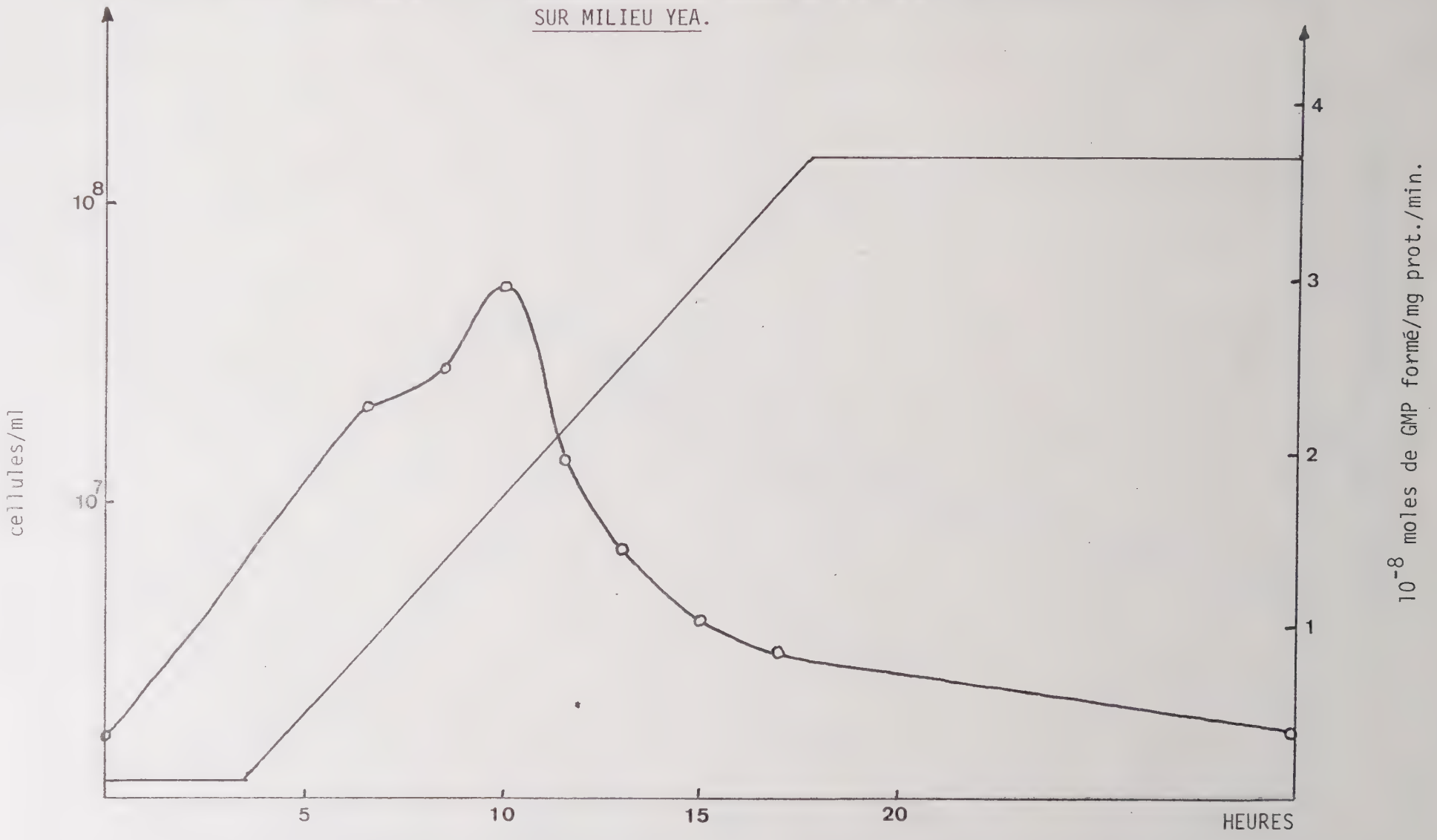
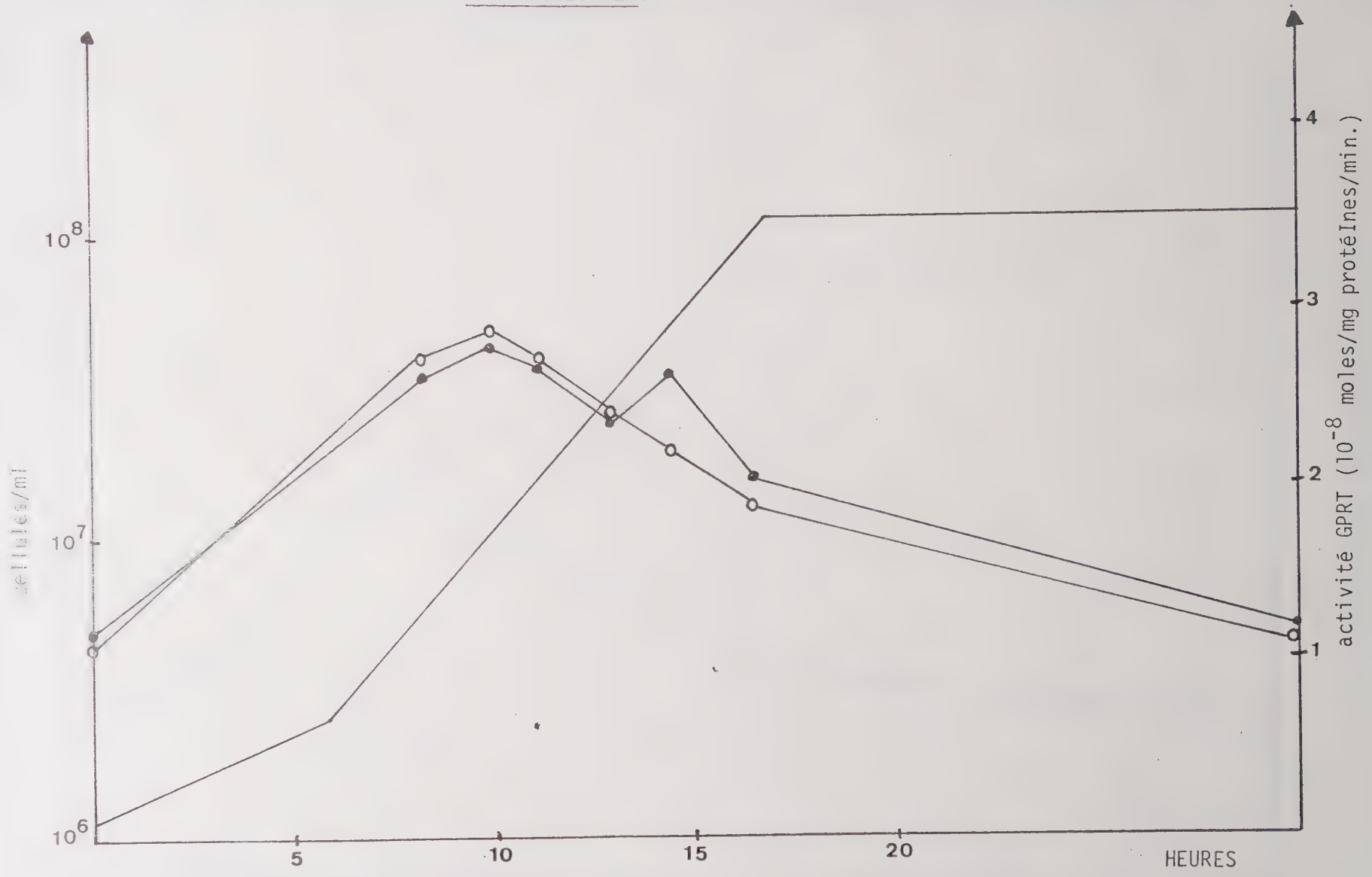


FIGURE 23bis

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE GPRT DANS UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE SUR MILIEU YEA.

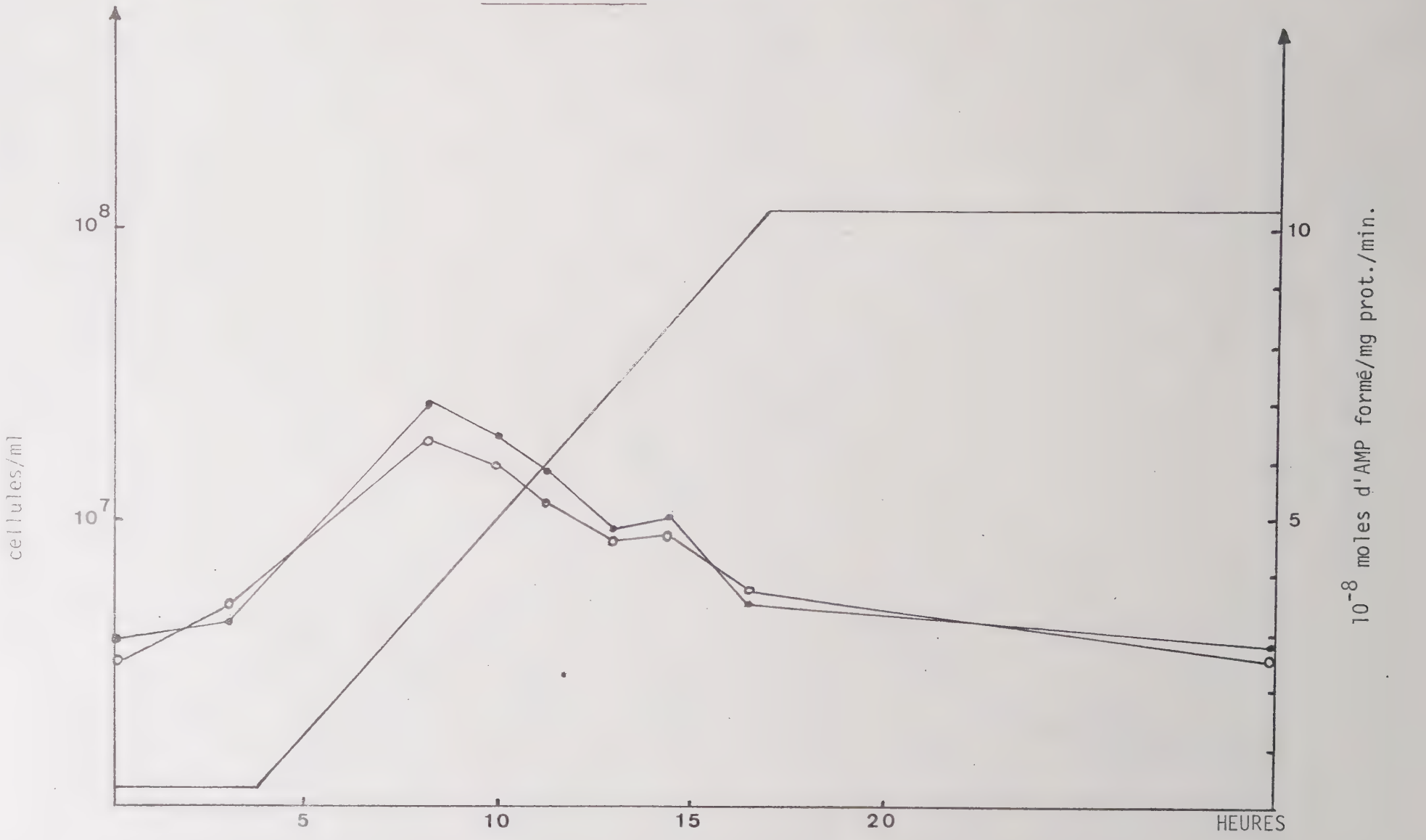


o : activité GPRT dans l'extrait brut, ● : activité GPRT dans l'extrait brut dialysé 24 H.

- Aux temps indiqués sur la figure, un échantillon de cellules est récolté et l'activité enzymatique est testée, comme indiqué dans le chapitre "matériel et méthodes".

FIGURE 24

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE APRT D'UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE SUR MILIEU YEA.

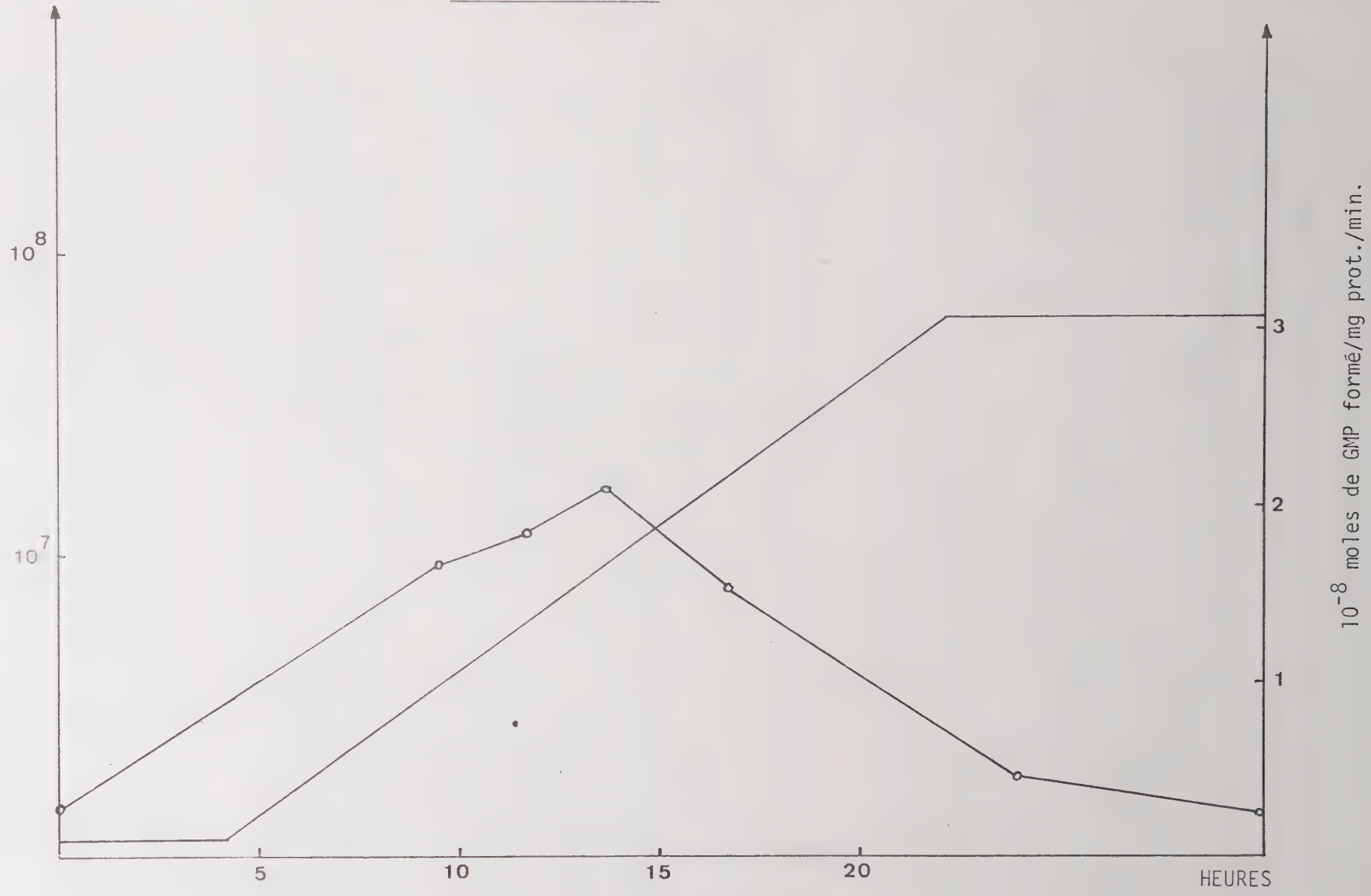


o : extrait brut

• : extrait brut dialysé 24 heures

FIGURE 25

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE GPRT DANS L'EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE EN MILIEU MINIMUM.



3) L'A-PRT et la G-PRT de la souche sauvage sur milieu YEA et MMA.

Comme l'indiquent les figures 22, 23, 23bis, 24, les deux pyrophosphorylases subissent, sur milieu YEA, des variations d'activité strictement concomitantes des variations "d'uptake" des bases puriques, avec également leur maximum d'activité à 10^7 cellules/ml.

Les courbes de variations des deux activités PRTs, mesurées dans les extraits bruts de la souche sauvage, ne sont pas modifiées après une dialyse de 24 Heures contre du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7,8 , 10 % glycérol (23bis, 24).

La figure 25 nous montre que nous retrouvons également une courbe de variation de même allure pour l'activité GPRT sur milieu MMA. Notons cependant que les variations d'activité de cet enzyme sur YEA sont plus importantes que celles enregistrées sur milieu MMA.

Notons enfin que, comme nous l'avons vu au niveau des variations de "l'uptake" d'adénine et de guanine (figure 20) où l'entrée de l'adénine dans la cellule est nettement plus importante que l'entrée de guanine, nous retrouvons le même phénomène au niveau des PRTs ; puisque l'activité spécifique APRT est trois fois plus élevée que l'activité spécifique GPRT (tableau V). Il est probable que ceci traduise, au niveau cellulaire, l'importance respective des pools des dérivés de l'adénine et de la guanine : ainsi, la levure S. Pombe présente un pool intra-cellulaire d'AMP dix fois supérieur à celui du GMP (Reichert et Nagy, communication personnelle). Ces faits semblent logiques compte tenu du rôle fondamental de l'ATP sur le plan énergétique.

De la même façon, le facteur de variation de l'activité APRT, moins élevé que celui observé pour l'activité GPRT, peut traduire le fait que le taux des dérivés de l'adénine dans la cellule ne descend jamais en-dessous d'un seuil critique, où la levure viendrait à manquer d'ATP pour ses fonctions vitales.

Au moment de l'étude des variations de "l'uptake" des bases puriques, nous avons vu qu'après 48 Heures de préculture sur milieu liquide YEA, le pool intracellulaire des bases puriques devait être très élevé ; M. Winter a montré qu'au même moment le pool de nucléotides était très bas (63).

On peut penser que la valeur élevée du pool de bases puriques entraine la variation d'activité spécifique des PRTs pendant la phase exponentielle, afin de permettre une reconstitution du pool interne des nucléotides, indispensablesau bon développement de la cellule.

La possibilité d'existence d'un ou plusieurs inducteurs de variations d'activité des PRTs, nous a conduit à réaliser l'expérience que nous avons faite simultanément au niveau de l"uptake" de guanine et au niveau de la GPRT sur milieu MMA, à savoir : est-ce que le fait de supplémenter le milieu MMA en hypoxanthine,au niveau du maximum d'activité perméasique et pyrophosphorilasique,peut permettre à la cellule de maintenir son activité enzymatique à son maximum ? Le protocole suivi est le même que celui décrit dans le paragraphe concernant "l'uptake" de guanine. Les résultats sont rassemblés dans le tableau V. Il apparait nettement que l'addition d'hypoxanthine dans le milieu de culture est sans effet sur les variations d'activité de la GPRT en milieu MMA.

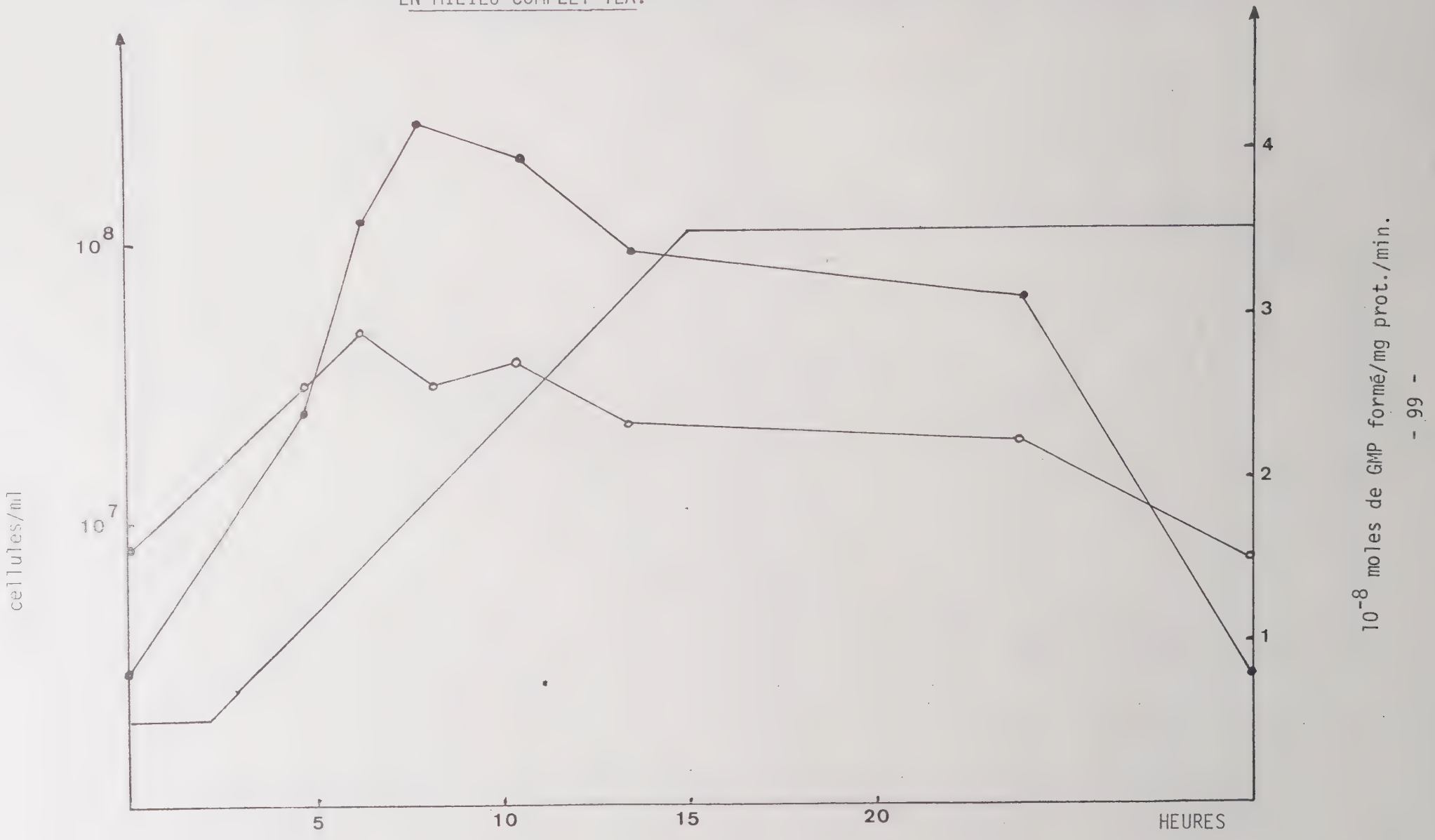
Il était important de vérifier que les variations d'activité des PRTs au cours de la croissance de la levure n'étaient pas la conséquence directe d'une action protéolytique quelconque.

En effet, l'activité des endopeptidases et exopeptidases chez la levure suit des variations parallèles à la courbe de croissance. (64, 65) Ceci pourrait expliquer la chute des activités de "l'uptake" et des PRTs à l'abord de la phase stationnaire.

Nous avons donc réalisé l'expérience suivante d'après Pringle (67) : trois cultures de la souche sauvage en milieu YEA sont menées jusqu'à la phase stationnaire,dont l'une d'entre elles en présence de fluorure de phénylméthylsulfonate (FPMS). La première culture est broyée normalement à 0°C, la seconde est broyée en présence d'EDTA, la troisième en présence de FPMS. On n'observe aucune différence d'activité PRT entre ces trois extraits bruts. Sachant que le FPMS est un ihhibiteur des protéases B et C et que l'EDTA complexe les ions métalliques divalents indispensables à l'action de la protéase A, il semble probable que les variations d'activités des PRTs sont indépendantes d'un effet protéolytique. Ces résultats sont résumés dans le tableau V. Cependant, nous ne pouvons prétendre nous protéger de toute action des protéases avec seulement l'EDTA et le FPMS car il existe à côté des protéases A,B et C des carboxypeptidases et des aminopeptidases (69,70).

FIGURE 26

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE GPRT DANS UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE gup 1 CULTIVEE EN MILIEU COMPLET YEA.

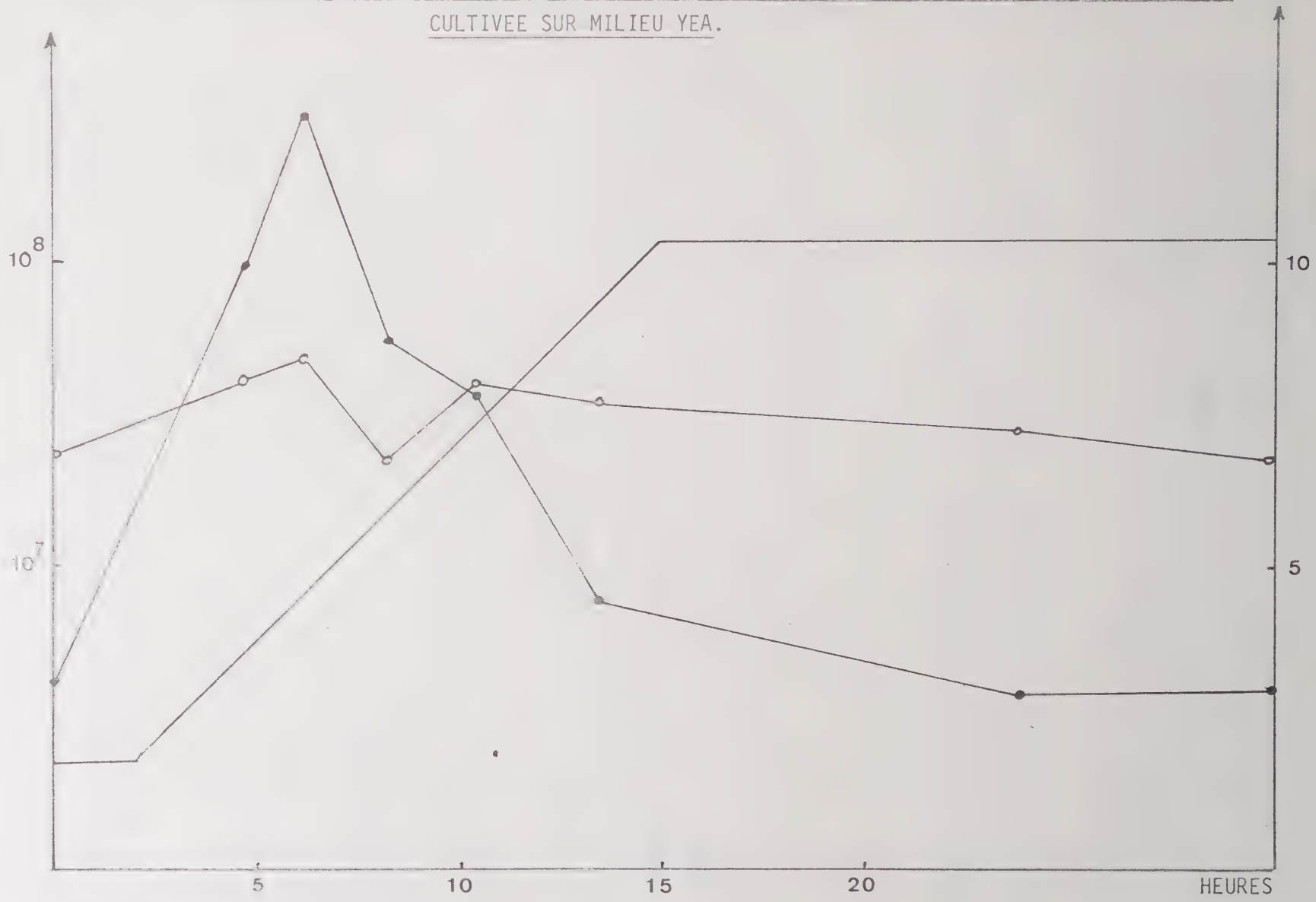


o : extrait brut

● : extrait brut dialysé 24 Heures.

FIGURE 27

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE DE L'APRT DANS UN EXTRAIT BRUT DE LA SOUCHE gup 1 CULTIVEE SUR MILIEU YEA.



○ : extrait brut

● : extrait brut dialysé 24 Heures.

De cette étude de la souche sauvage sur milieu YEA et sur milieu MMA, nous pouvons dès maintenant dégager un argument en faveur d'une implication possible des PRTs dans le transport des purines : les variations d'activité de "l'uptake" et des phosphoribosyltransférases sont identiques et concomitantes sur milieu minimum et sur milieu complet.
Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence le ou les inducteurs de ces variations.(68)

Compte tenu du fait que l'activité PRPP synthétase ne semble pas varier au cours de la croissance de la levure, il sera intéressant d'étudier dans le chapitre suivant les variations du pool de PRPP dans les mêmes conditions.

B-) LA SOUCHE "GUP 1".

Comme nous l'avons vu, ce mutant résistant à la 8-azaguanine, présente une vitesse initiale d'entrée de la guanine et de l'adénine affectée sur milieu MMA riche en ions ammonium. La guanine notamment, ne semble pénétrer dans la cellule que par diffusion simple. Il était intéressant de voir si les PRTs de gup 1, apparemment normales in vitro, présentaient des courbes de variation différentes de la souche sauvage.

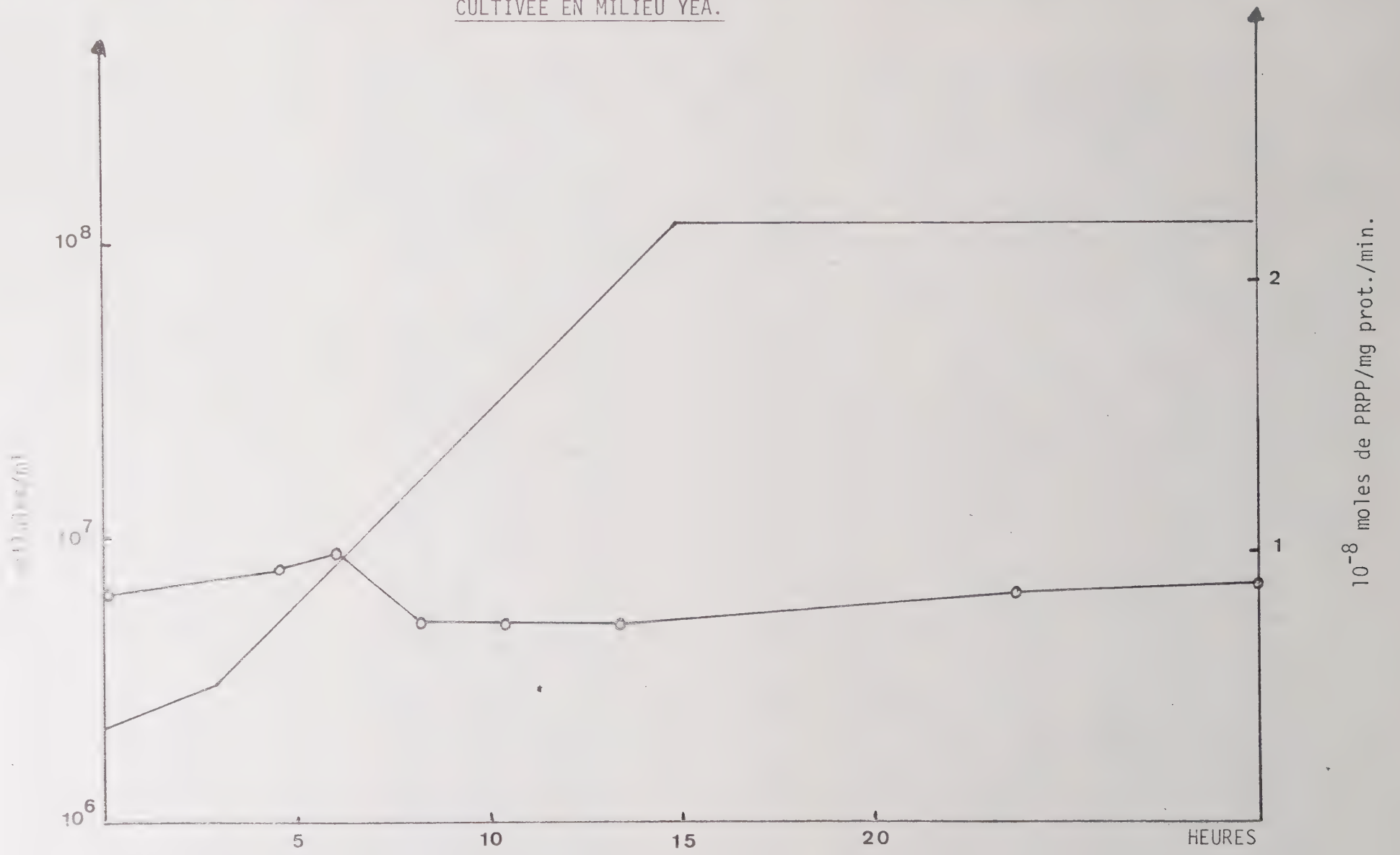
Comme l'indique la figure 26, les extraits bruts non dialysés ne présentent pas de variations nettes des deux activités PRTs.

Cependant, après 24 Heures de dialyse contre un tampon phosphate de potassium 0,01 M, 10 % glycérol, l'activité de la GPRT augmente nettement et le maximum apparait au même stade de croissance que chez la souche sauvage. Le niveau d'activité de cet enzyme dans les extraits dialysés est presque deux fois celui mesuré chez la souche sauvage. Rappelons que chez la souche sauvage, 24 Heures de dialyse sont sans effet sur les activités phsophoribosyltransférases.

Notons que ce phénomène apparait moins clairement pour l'APRT où la valeur de l'activité de l'enzyme dialysé n'est supérieure à celle de l'enzyme non dialysé qu'en début et milieu de phase exponentielle. (figure 27).

FIGURE 28

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR L'ACTIVITE DE LA PRPP SYNTHETASE D'UN EXTRAIT BRUT DIALYSE DE LA SOUCHE gup 1 CULTIVEE EN MILIEU YEA.



: extrait brut dialysé 24 H.

En trait continu : courbe de croissance de gup 1 sur YEA.

Gup 1 n'étant pas allèle de dap 1 et pur 1, l'augmentation de l'activité GPRT après dialyse ne peut être dûe à une modification des propriétés de cet enzyme. On peut donc envisager que la valeur plus faible del'activité GPRT dans les extraits non dialyses in vitro, pourrait peut-être correspondre à la présence d'un inhibiteur dont l'action inhibitrice in vivo serait totale. Dès lors, la capacité "d'uptake" très basse de ce mutant gup 1 pour la guanine pourrait être la conséquence de cette inhibition totale de la GPRT in vivo.
Nous avons essayé,sans succès, de mettre en évidence l'inhibiteur dialysable. L'extrait brut a été dialysé une nuit contre un faible volume d'eau. Après dialyse, le volume du dialysat a été encore réduit par passage sur un concentrateur"amicon" . Nous avons testé l'effet inhibiteur de cette solution ainsi obtenue sur un extrait de la souche sauvage vis à vis des deux activités PRTs : aucune inhibition n'a malheureusement été observée.

La courbe d'activité de la PRPP synthétase de gup 1 est identique à celle de la souche sauvage (figure 28).

En conclusion, si nos résultats semblent mettre en évidence des variations de synthèse des PRTs liées aux variations de l"uptake" des bases puriques au cours de la croissance de la souche sauvage, il faut reconnaitre que le dosage in vitro des phosphoribosyltransferases ne permet qu'une approche imparfaite du problème notamment dans le cas du mutant gup 1.(72
En effet, comme nous l'avons vu, il est probable que l'activité GPRT in vivo chez gup 1 soit toute autre que celle quel'on observe dans les extraits in vitro.(68)

ETUDE DU POOL DE PRPP

L'étude du pool de PRPP restait indispensable si l'on voulait cerner notre problème de plus près. En effet, cette plaque tournante du métabolisme purique peut y jouer un rôle régulateur important puisque le PRPP est à la fois substrat des PRTs et de la PRPP amidotransferase, premier enzyme de la voie"de novo". De nombreux auteurs tels que Nyhan (73), Holmes (74), ou Green, pensent que le niveau de ce métabolite dans la cellule influe sur la voie de biosynthèse de novo et que le pool intra-cellulaire de nucléotides varie à l'inverse du pool de PRPP.(75)

1) Validité de la méthode de dosage.

Rappelons que le PRPP est dosé dans la cellule par la conversion de l'acide orotique marqué au carbone 14 en OMP radio-actif à l'aide d'une préparation commerciale d'orotate phosphoribosyltransferase.

Nous avons établi, pour notre méthode de dosage, une relation linéaire entre l'OMP formé et la quantité de cellules lyophilisées jusqu'à $5\ 10^9$ cellules,et pour une quantité d'extrait dans l'incubation pouvant aller jusqu'à 50 µl.

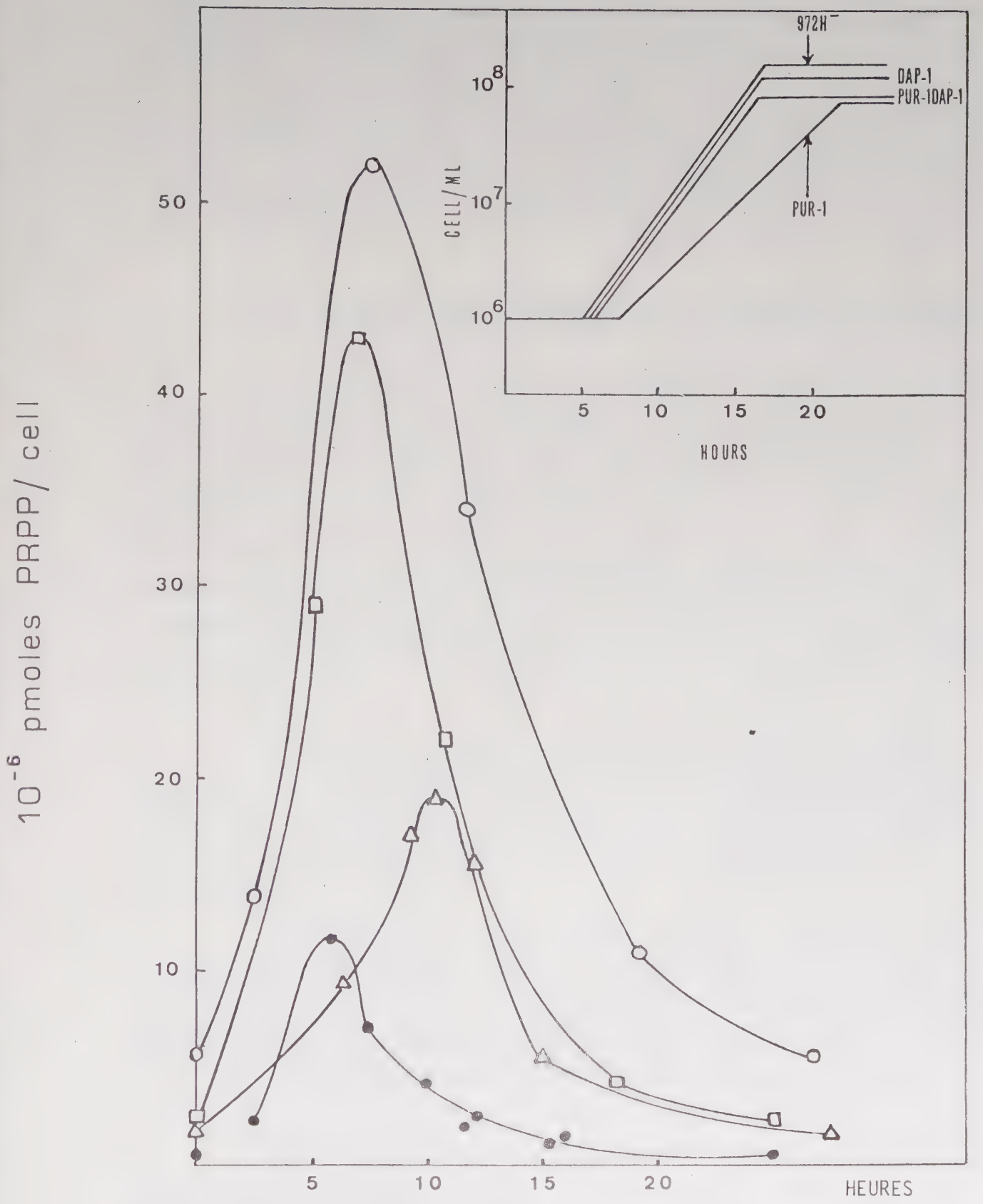
Différents modes d'extraction du pool de PRPP de S. Pombe ont été testés :

- par ébullition pendant deux minutes d'une suspension cellulaire aqueuse supplémentée par de l'EDTA 1mM, comme la pratique Lalanne et Henderson (76).
- par deux traitements successifs à l'acide perchlorique, suivis d'une neutralisation par la potasse avec précipitation du perchlorate de potassium selon la méthode de Bagnara et Finch (77).

Ces deux procédés ne sont pas applicables à S. Pombe. C'est pourquoi nous avons dû mettre au point une méthode d'extraction par l'acide acétique suivie d'une lyophilisation immédiate.

FIGURE 29

VARIATIONS DU POOL INTRACELLULAIRE DE PRPP PENDANT LA CROISSANCE DE LA LEVURE CHEZ LES CELLULES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS, SUR MILIEU DE CULTURE YEA.



● : souche sauvage , △ : souche pur 1 , □ : souche dap 1

○ : souche pur 1-dap 1

Les courbes de croissance des différentes souches sur milieu YEA, sont représentées sur la figure en haut et à droite.

Le traitement des lyophilisats par du charbon norit A augmente la quantité de PRPP dosable grâce à l'adsorption des nucléotides inhibiteurs de L'OPRT. Nous utilisons comme contrôle dans ce type de dosage le mélange d'incubation sans les extraits cellulaires.

Lorsque nous appliquons notre méthode d'extraction à une quantité précise de PRPP commercial, nous ne recouvrons que 50 à 55 % de la quantité initiale : c'est pourquoi toutes les valeurs du PRPP mesurées dans les cellules de S. Pombe seront rectifiées par un facteur 2.

2) Variations du pool de PRPP pendant la croissance de la levure.

Comme le montre la figure 29, la quantité de PRPP par cellule de la souche sauvage présente un accroissement rapide pendant la phase de latence, atteint un maximum de 12 10^{-18} moles par cellule au début de la phase exponentielle,suivi immédiatement d'une chute rapide pendant cette même phase. Afin d'être certain que cette décroissance du pool n'est pas dûe à l'apparition d'un métabolite qui pourrait inhiber l'essai, du PRPP commercial est ajouté avant l'extraction à un échantillon de cellules récoltées après 15 Heures de culture. Le dosage ne montre aucune différence entre la quantité de PRPP mesurée en présence ou en l'absence des lyophilisats cellulaires.

La variation du contenu intra-cellulaire de PRPP est fortement amplifiée chez les mutants dépourvus d'activité phosphoribosyltransferase (figure 29). La souche dap 1,déficiente en APRT, atteint une concentration de PRPP 4 fois supérieure à celle de la souche sauvage, c'est à dire 43 10^{-18} moles par cellule.

L'absence d'activité GPRT, chez la souche pur 1, entraine un doublement du pool de PRPP par rapport à la souche sauvage jusqu'à atteindre une valeur de 19 10^{-18} moles de PRPP par cellule. Chez ce mutant, le déplacement du pic de la courbe du pool de PRPP par rapport aux autres souches est à mettre en corrélation avec le taux de croissance plus lent de pur 1 (figure 29).

Le double mutant dap 1 pur 1, cumule les effets des deux mutations au niveau des PRTs, atteignant ainsi une concentration intra-cellulaire de PRPP de 52 10^{-18} moles par cellule.

Ces variations importantes du pool de PRPP pendant la croissance de la levure ne peuvent être reliées à un phénomène de régulation "répression- dérépression" de la PRPP synthétase puisque nous avons vu que cet enzyme se comporte comme un"enzyme constitutif" , ne subissant aucune variation d'activité pendant la croissance.

Le pool de PRPP commence à augmenter très rapidement alors que les cellules sont encore en phase de latence, probablement dès que le niveau d'ATP intra-cellulaire est suffisamment élevé pour l'activité de la PRPP synthétase (78).

La chute rapide du pool de PRPP, 6 à 8 heures après l'inoculation de la culture, correspond au démarrage de l'activité des enzymes anaboliques ayant le PRPP pour substrat : nous avons vu que le maximum d'activité des deux phosphoribosyltransferases prenait place environ 11 heures après le début de la culture, c'est à dire lorsque la concentration cellulaire atteint 10^7 cellules/ml. En fait, la chute du pool de PRPP est superposable à l'accroissement d'activité des PRTs sur milieu YEA.

On peut penser que le niveau de concentration en PRPP chez les souches dap 1 et pur 1, déficientes respectivement en APRT et GPRT, peut refléter l'importance métabolique relative de chaque"voie de réutilisation": le rapport de l'excès de PRPP, en référence à la souche sauvage, entre dap 1 et pur 1 est de 5 à 1. Le pool de pur 1 relativement peu élevé par rapport à celui de dap 1 peut rendre compte de deux phénomènes :

- Comme nous l'avons vu, l'activité spécifique de l'APRT est trois fois supérieure à celle de la GPRT.

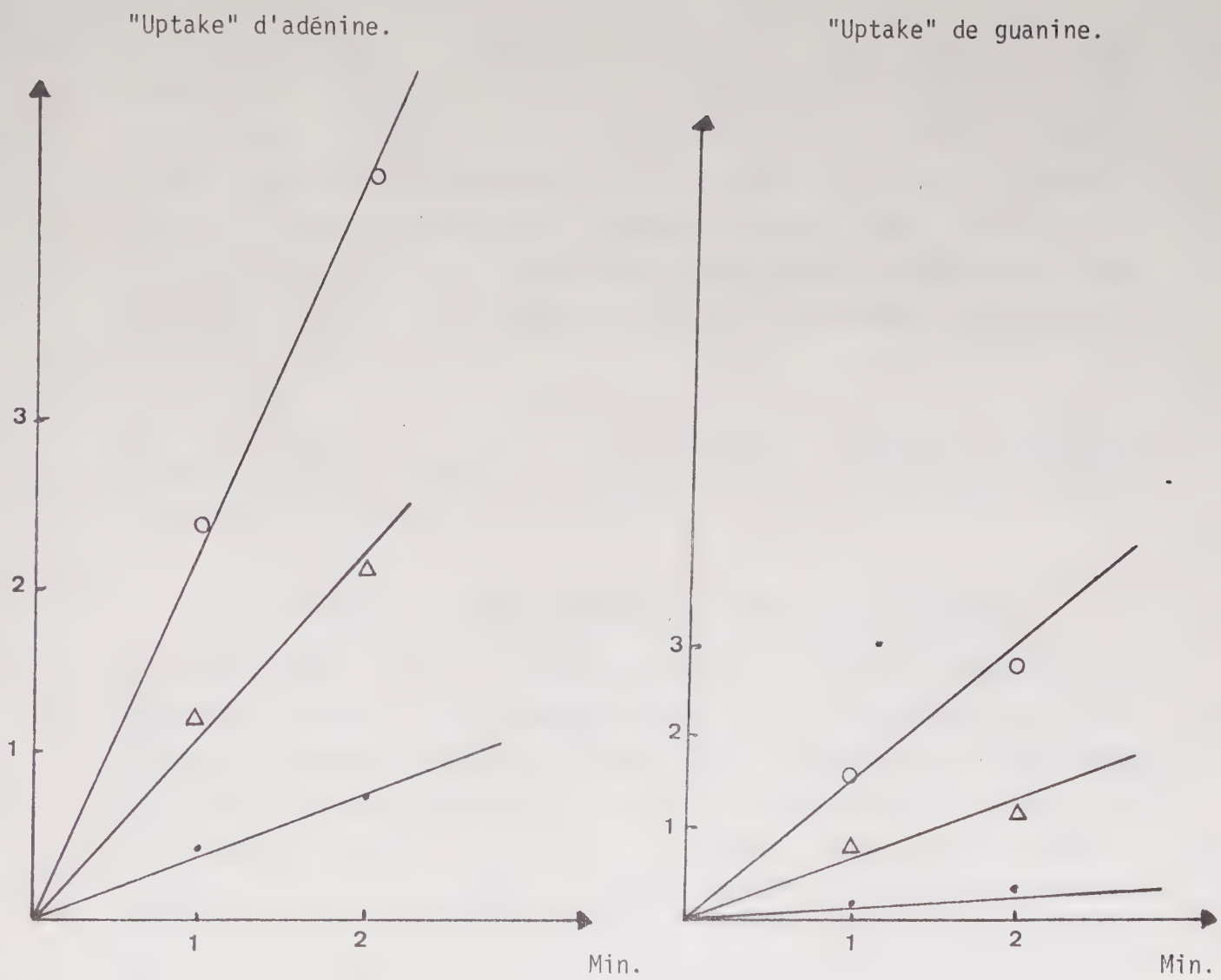
- La voie de biosynthèse de novo est accélérée chez pur 1 contrairement à dap 1 (79).

Cette différence de phénotypes des mutants pur 1 et dap 1 pourrait découler de la sensibilité à la rétroinhibition de la PRPP amidotransferase, premier enzyme de la voie"de novo", qui est 10 fois plus élevée pour le GMP que pour l'AMP (80).

Enfin, le fait que dap 1 ne surproduit pas de nucléotides par la voie de novo en dépit d'une forte concentration de PRPP disponible dans la cellule, indique que le contrôle par rétroinhibition du GMP est effectif et que cette voie de biosynthèse ne peut être stimulée par un excès de PRPP, comme l'ont proposé Holmes et Green chez les cellules du foie de souris. (81, 82, 83, 84).

FIGURE 29 bis

EFFET DE LA FORMYCINE SUR "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES CHEZ LES CELLULES DE LA SOUCHE SAUVAGE DE S. POMBE CULTIVEE EN MILIEU MMA N100 TAMPONNE A pH 4.



○ : Formycine 0 mM dans le milieu de culture.

△ : Formycine 0,01 mM dans le milieu de culture.

• : Formycine 0,1 mM dans le milieu de culture.

Les cellules, en phase exponentielle, sont cultivées pendant une génération en présence de Formycine aux concentrations ci-dessus, puis immédiatement récoltées pour subir "l'uptake".

3) Etude de "l'uptake" des bases puriques et du pool de PRPP chez les cellules cultivées en présence de "Formycine."

Nous allons voir que ce paragraphe est,en quelque sorte, une "justification a posteriori" du fait que nous avons voulu lier l'étude du pool de PRPP et de la PRPP synthétase à l'étude du transport des bases puriques.

La Formycine, un analogue de l'adénosine, a été découverte en 1964 par Hori et al. (87). J.F. Henderson a clairement montré,chez les cellules de mammifères, que cette substance bloque la synthèse du PRPP en ihnibant la PRPP synthétase, interdisant ainsi la synthèse de novo des nucléotides puriques. L'auteur suggère que ce nucléoside pénètre dans la cellule et est transformé par la voie biologique en Formycine triphosphate qui entre en compétition avec l'ATP, substrat de la PRPP synthétase, bloquant ainsi la réaction enzymatique (88).

Nous avons voulu savoir si cet analogue de l'adénosine inhibait également la synthèse du PRPP chez S. Pombe, et pouvait par ce biais, affecter "l'uptake" des basespuriques.

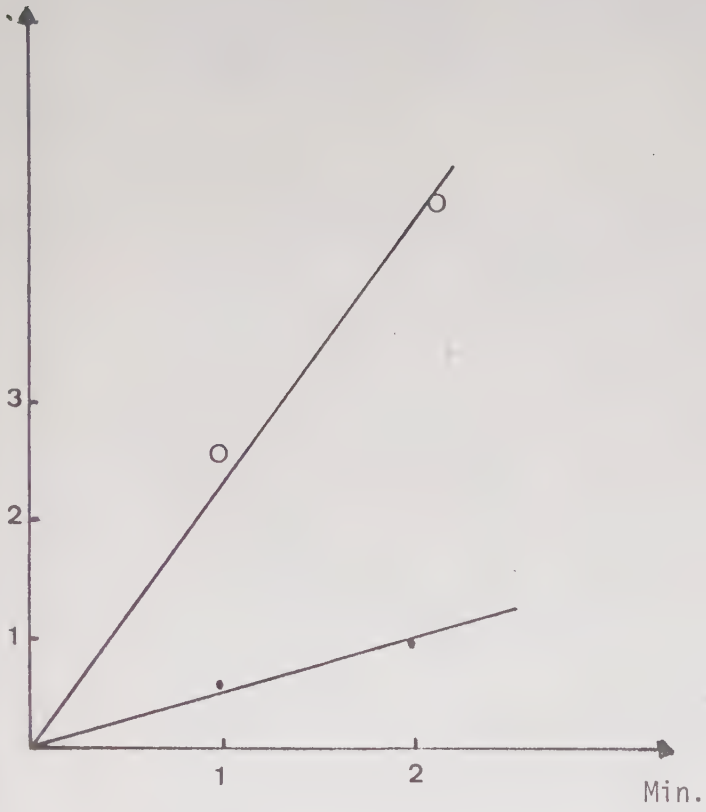
a) "L'uptake" des bases puriques en présence de Formycine.

Nous avons cultivé la souche sauvage,dans 3 fioles différentes,sur milieu MMA tamponné à pH4. Deux générations avant la récolte des cellules en vue de la mesure de"l'uptake",.c'est à dire environ à 2,5 10^6 cellules/ml dans nos conditions, la fiole n° 1 reçoit 0,1 M de Formycine, la fiole n° 2 0,01 M de Formycine, et la fiole n° 3 ne reçoit rien. Les cultures sont arrêtées simultanément lorsque la concentration cellulaire atteint approximativement 10^7 cellules/ml (la Formycine n'affecte la croissance de la levure que d'une façon très négligeable). Les cellules de chaque fiole subissent alors un "uptake" de guanine et d'adénine, après qu'elles aient été soigneusement lavées et resuspendues pendant 10 minutes en milieu MMA frais, sans Formycine. Comme le montre la figure 29bis, la préculture en présence de Formycine, inhibe fortement et à peu près de la même façon "l'uptake" des deux bases puriques: environ de 50 % pour 0,01 M de Formycine et de 84 % pour 0,1 M de Formycine.

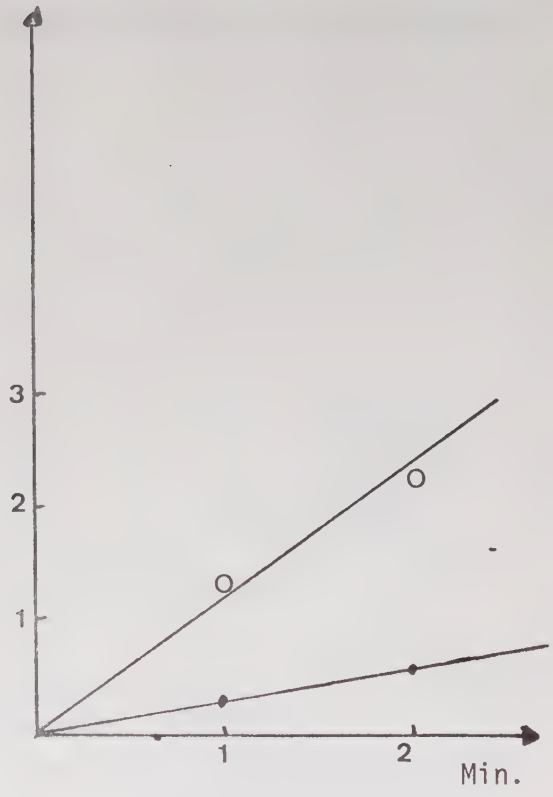
FIGURE 29 ter

EFFET DE LA FORMYCINE SUR "L'UPTAKE" DES BASES PURIQUES CHEZ LES CELLULES DE LA SOUCHE dap 1 CULTIVEE EN MILIEU MMA N100 TAMPONNE A pH 4.

"Uptake" d'adénine.



"Uptake" de guanine.



10^{-3} cpm/cellule

O : Formycine 0 mM dans le milieu de culture.

• : Formycine 0,05 mM dans le milieu de culture.

Nous avons vérifié que "l'uptake" des bases puriques par les cellules de la fiole n° 3 n'est pas modifié lorsque la Formycine n'est ajoutée que dans le milieu d'incubation au moment de la mesure de l'activité perméasique. Autrement dit, la Formycine n'agit pas, au moment de la mesure, comme un inhibiteur classique des perméases de la guanine et de l'adénine. Mais plutôt, cette molécule, lorsque les cellules sont cultivées en sa présence pendant une ou deux générations, pénètre dans la levure et est métabolisée ; il est probable que c'est sous cette forme métabolisée que la Formycine bloque une ou plusieurs voies de biosynthèse et peut-être,par là-même, "l'uptake".

Nous avons répété la même expérience avec le mutant dap 1, sur milieu MMA pH4, en présence de Formycine 0,05 M pendant une génération, c'est à dire de 5 10^6 cellules/ml à 10^7 cellules/ml (la croissance du mutant n'est pas affectée par rapport au témoin sans Formycine).
Nous avons obtenu dans ces conditions des "uptakes" également très affectés pour les deux bases puriques: de 78% pour la guanine et de 80% pour l'adénine (Figure 29ter). Notons que,contrairement à la souche sauvage, la souche dap 1 voit sa croissance affectée par la Formycine au bout de 4 heures de culture en sa présence, soit deux générations environ.
Compte tenu de la déficience en activité APRT du mutant dap 1, il est probable que la Formycine, pour entrer dans la cellule, doive passer par la voie de l'adénosine kinase ou par la voie de l'adénosine desaminase.
Sur milieu YEA, la souche dap 1 ne présente pas "d'uptake" affecté en présence de Formycine : on peut penser que,dans ce cas là,cette molécule subit une forte dilution par les autres nucléosides présents dans le milieu complet, qui entrent en compétition avec elle.

b) Le pool de PRPP en présence de Formycine.

Comme nous l'avons vu sur la figure 29 , le mutant dap 1 avait l'avantage, sur la souche sauvage, de présenter un maximum de pool de PRPP beaucoup plus élevé. Compte tenu de ce que la Formycine était sans effet sur "l'uptake" des bases puriques en milieu YEA, nous avons remesuré le contenu intracellulaire de PRPP du mutant sur milieu MMA.

Sur milieu MMA pH4, le maximum du pool de PRPP de dap 1 se situe au même moment que sur milieu YEA, c'est à dire à environ 4 10^6 cellules/ml dans nos conditions de culture; mais il représente en valeur absolue seulement 65 % de celui obtenu sur milieu complet.
Nous avons donc cultivé deux lots de cellules sur milieu MMA. Lorsque la concentration cellulaire atteint 1,8 10^6 cellules/ml, nous ajoutons dans une des deux fioles 0,05 M de Formycine. Après une génération en présence de cet analogue, c'est à dire à environ 3,5 10^6 cellules/ml, le contenu intracellulaire de PRPP est mesuré dans les cellules cultivées avec et sans Formycine. Le pool de PRPP des cellules cultivées en présence de Formycine, représente 29 % de celui des cellules cultivées en l'absence de Formycine. Donc, chez S. Pombe comme chez les cellules de mammifères, cet analogue de l'adénosine semble bloquer la synthèse du PRPP; peut-etre en inhibant la PRPP synthétase, par l'intermédiaire de la Formycine 5' triphosphate, comme l'a suggéré Henderson, (88).

Nous pouvons penser que c'est peut-être cet arrêt de la synthèse de PRPP, et donc le manque de ce composé énergétique dans la cellule, qui est à l'origine de la chute de"l'uptake" des bases puriques en présence de Formycine. C'est pourquoi il nous semblait indispensable d'associer l'étude de la PRPP synthétase et du pool de PRPP à l'élucidation du problème du transport de l'adénine et de la guanine.
Notons cependant que la baisse de "l'uptake" peut ne pas être la conséquence de la baisse du pool de PRPP, mais qu'il peut s'agir d'une inhibition in vivo de l'APRT par la Formycine : en effet, Henderson a montré que la Formycine 5' monophosphate était un inhibiteur de l'adénine phosphoribosyltransferase in vitro.

La Formycine nous a été grâcieusement fournie par J.F. Henderson.

ETUDE DE "L'UPTAKE" CHEZ LES PROTOPLASTES DE S. POMBE.

A) L'OBTENTION DES PROTOPLASTES PROPREMENT DITE.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre "matériel et méthodes", la conversion des cellules de S. Pombe en protoplastes est complète au bout de 90 minutes d'incubation à 30°C, en présence de l'enzyme d'escargot supplémenté avec les deux glucanases.(66)

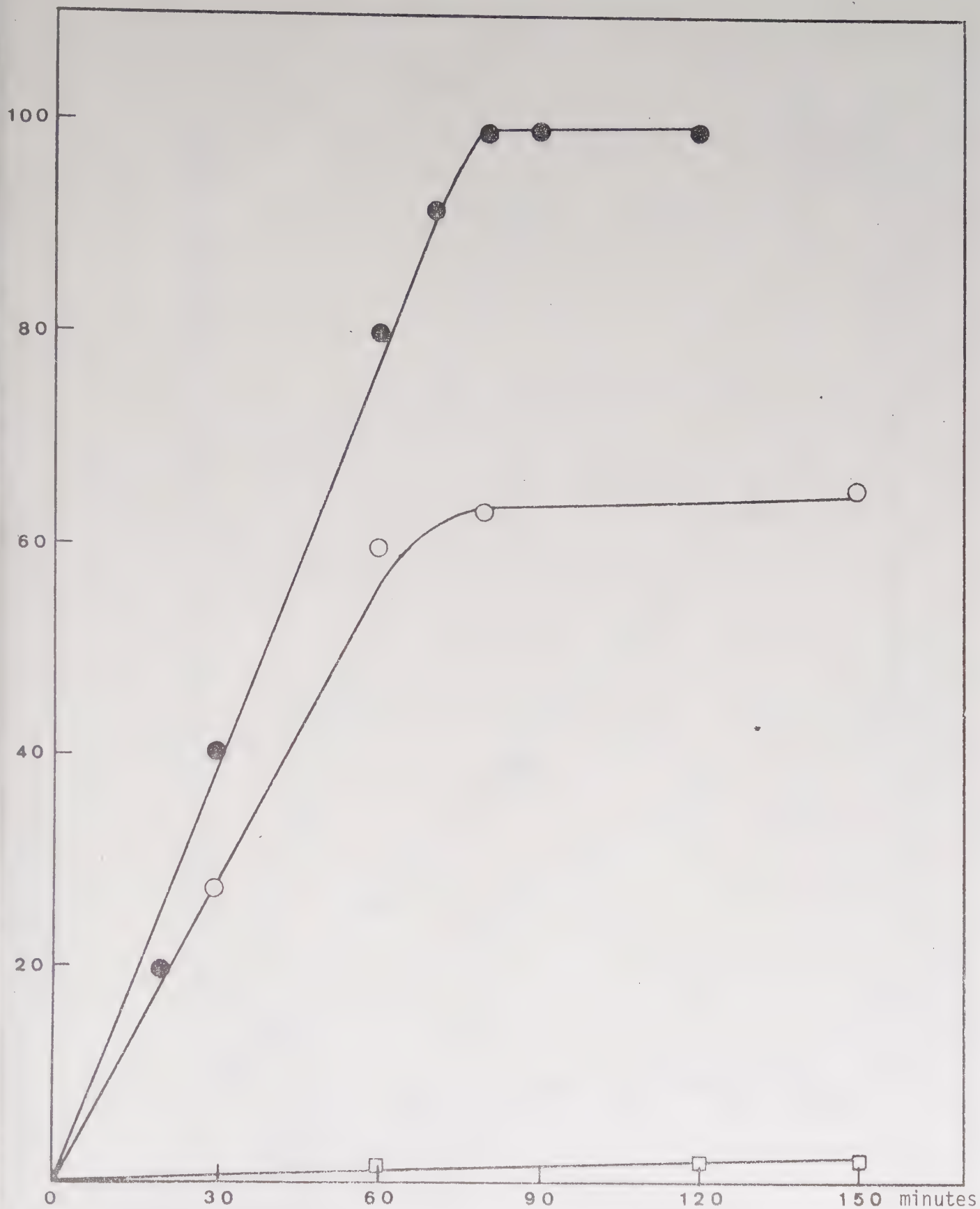
En l'absence des glucanases, la production de protoplastes est de 60 % seulement en 90 minutes et elle n'augmente plus après ce délai.(89,90)
Le mélange des deux glucanases sans l'enzyme d'escargot est sans effet.
Si les cellules ne sont pas cultivées sur le milieu YPGT, riche en acides aminés soufrés, on n'obtient que 50 % de protoplastes après 3 heures d'incubation.(39).
Quand les cellules sont traitées avec seulement 1 mg/ml de chaque glucanase, au lieu de 5 mg/ml, la transformation est très lente : 90 % de protoplastes sont obtenus après 5 Heures d'incubation.
Ces résultats sont cumulés dans la figure 30.

Notons que, bien que quelques amas cellulaires soient observables encore après 45 minutes d'incubation, les protoplastes sont parfaitement séparés les uns des autres au bout de 80 minutes.

La façon dont se forment les protoplastes est nettement observable au microscope : le cytoplasme avec sa membrane plasmique sort dans le milieu isotonique,en se comprimant, par un orifice dans la paroi. Ce phénomène permet au protoplaste de laisser une paroi intacte et vide derrière lui. Cela nous autorise à parler de protoplastes et non de "sphéroplastes" qui ont, par endroits, des morceaux de paroi accolées.

FIGURE 30

EFFETS DES ENZYMES LYTIQUES SUR LA PRODUCTION DE PROTOPLASTES DE S. POMBE.

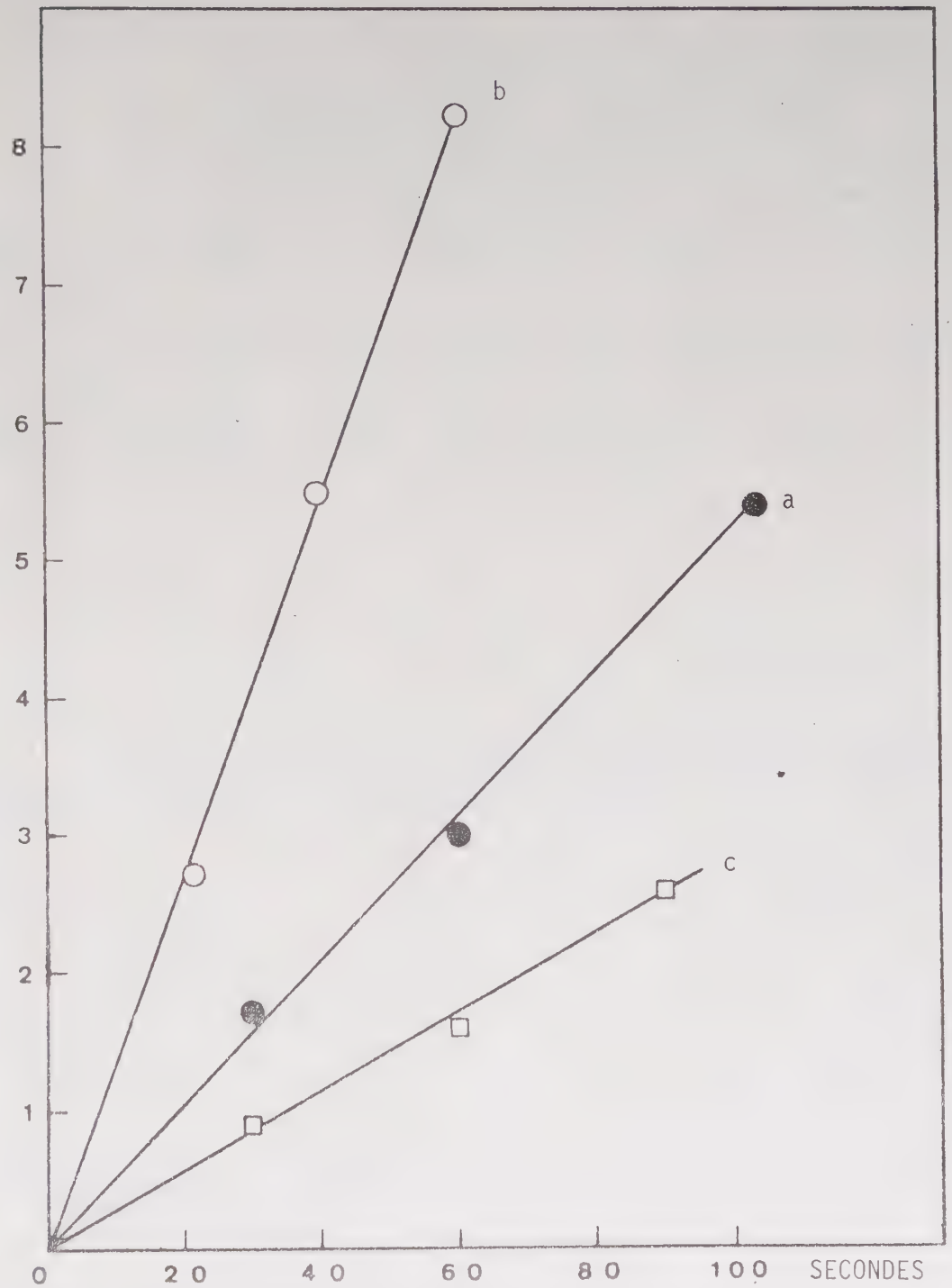


● : Enzyme d'escargot + α (1,3) glucanase + β (1,3) glucanase,
○ : Enzyme d'escargot seul
□ : α (1,3) glucanase + β (1,3) glucanase seules.

Le comptage des protoplastes et des cellules s'effectue sur cellule de Malassez.

FIGURE 31

VITESSE INITIALE "D'UPTAKE" DE LA GUANINE PAR LES PROTOPLASTES EN MILIEU MMG ISOTONIQUE ET L'EFFET DE CE MILIEU SUR "L'UPTAKE" DES CELLULES ENTIERES EN COMPARAISON DE LEUR ACTIVITE SUR MILIEU MINIMUM.



10^{-17} moles de guanine /cellule / minute.

a : ● : "Uptake" des protoplastes en milieu MMG.Culture des cellules en YPGT.

b : ○ : "Uptake" des cellules entières en milieu MMA. Culture en milieu MMA.

c : □ : "Uptake" des cellules entières en milieu MMG. Culture en milieu YPGT.

TABLEAU VI

NSTANTES CINETIQUES DE "L'UPTAKE" DE GUANINE CHEZ LES CELLULES ET LES PROTOPLASTES

	PROTOPLASTES	CELLULES ENTIERES	
	Milieu MMG	Milieu MMG	Milieu MMA
K_m (10^{-6} M)	1,1	1,1	0,7
V_m (10^{-17} mole/c/min)	3,05	1,5	11,5

Les cellules ont été cultivées en milieu YPGT et "l'uptake" a été mesuré dans les milieux indiqués ci-dessus.

REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK DE "L'UPTAKE" DE GUANINE PAR LES CELLULES ENTIERES ET LES PROTOPLASTES DE S. POMBE.

a, b, c : mêmes légendes que sur la figure 31.

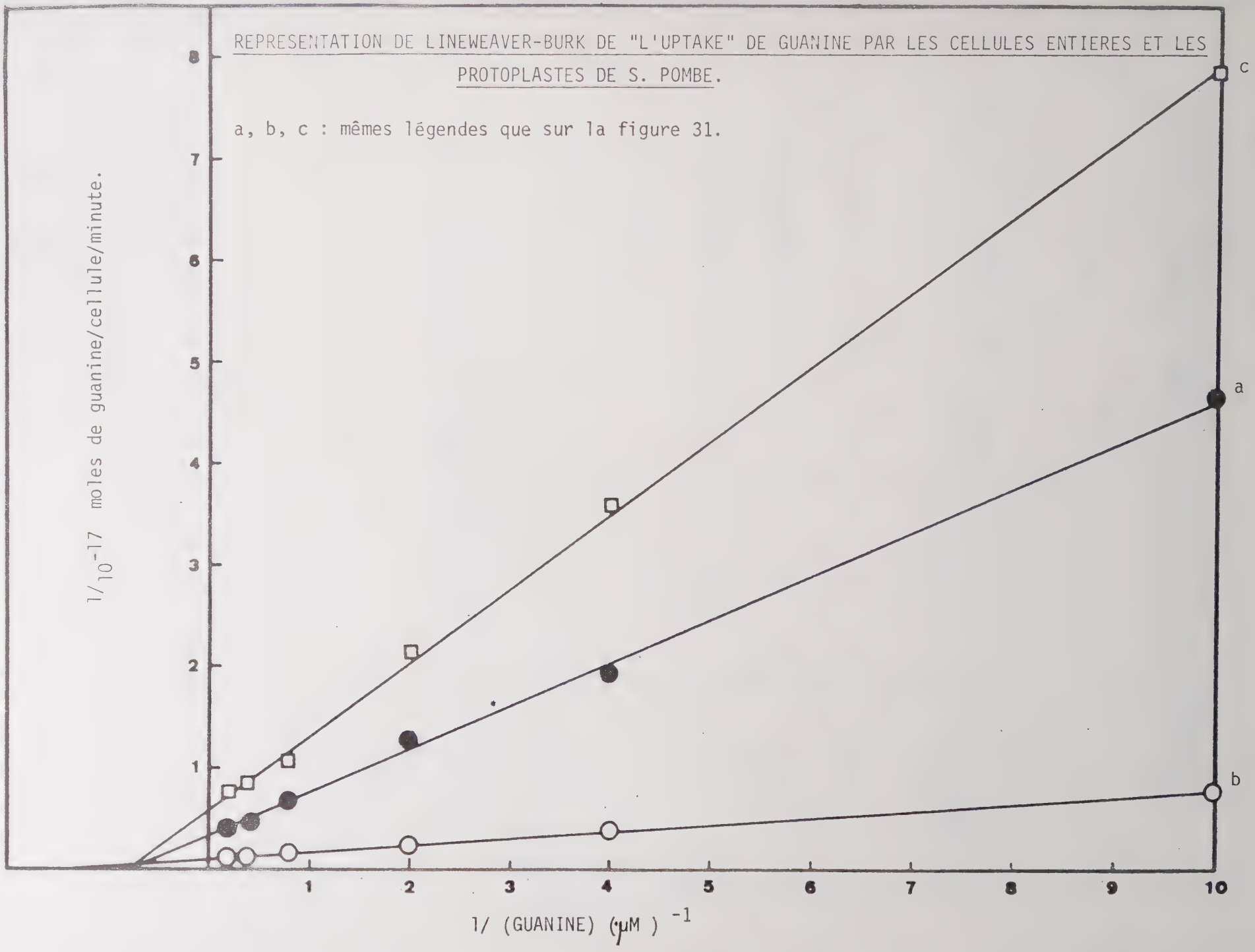


TABLEAU VII

EFFETS DES ANALOGUES STRUCTURAUX ET DES POISONS D'ENERGIE SUR "L'UPTAKE" DE GUANINE CHEZ LES CELLULES ET LES PROTOPLASTES

MODIFICATIONS DANS LE MELANGE D'INCUBATION DE "L'UPTAKE"	POURCENTAGE D'ACTIVITE RESIDUELLE	
	cellules	protoplastes
	100	100
Avec adénine 4 . 10^{-6} M	33	40
Avec hypoxanthine 4 . 10^{-6} M	43	56
Avec azaguanine 20 . 10^{-6} M	73	93
Sans glucose	7,4	10
Avec azide 20 . 10^{-3} M	7,4	1,7

Les cellules sont cultivées en milieu YPGT et "l'uptake" de guanine est testé en milieu MMG.

B) "L'UPTAKE" DE LA GUANINE PAR LES PROTOPLASTES EN COMPARAISON AVEC LES CELLULES ENTIERES.

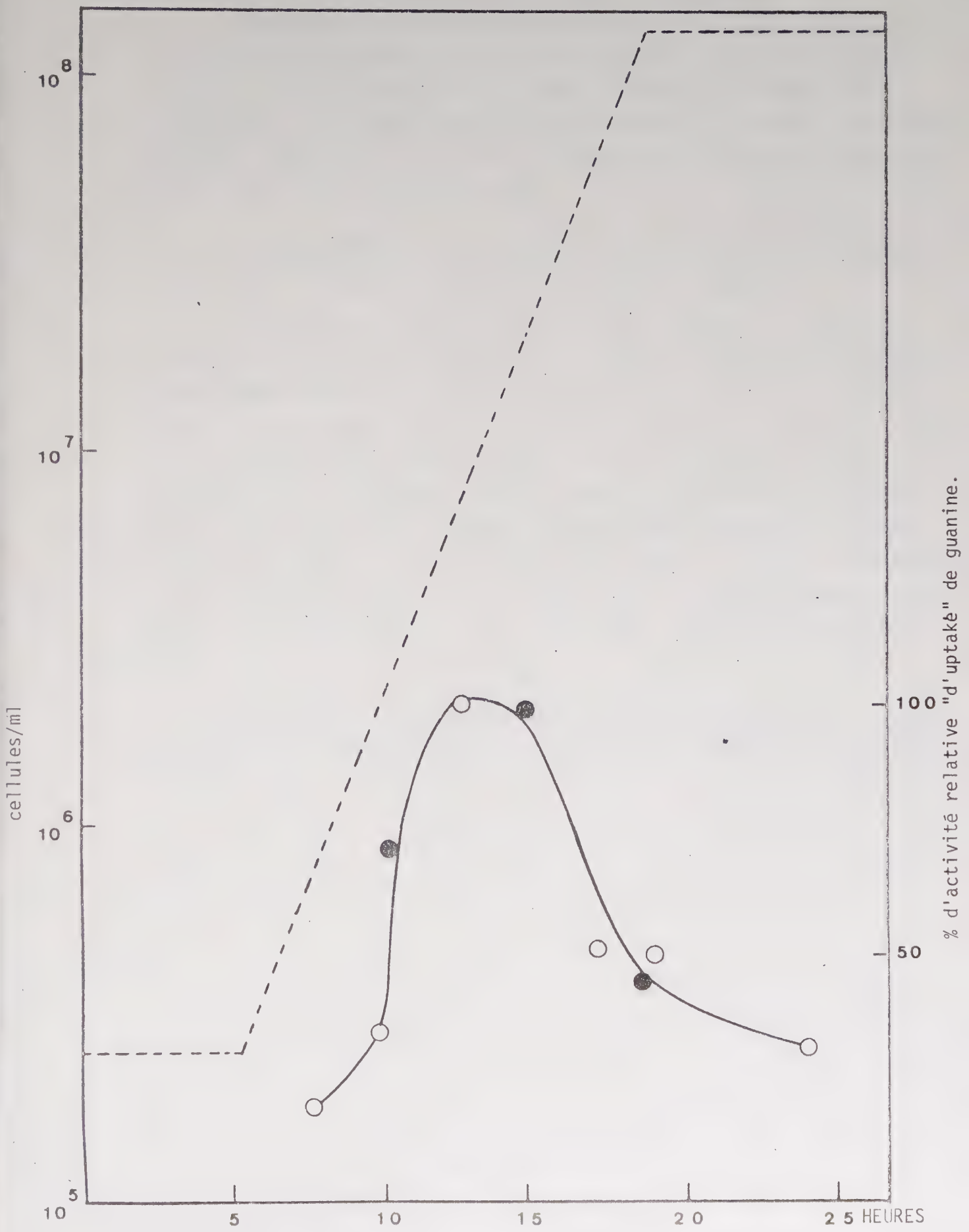
La valeur de "l'uptake" de guanine par les protoplastes suspendus dans le milieu MMG est montréesur la figure 31a. Cette valeur est inférieure à celle trouvée pour des cellules entières cultivées et resuspendues dans le milieu MMA (figure 31b). Cependant, quand les cellules intactes sont cultivées en milieu YPGT et testées pour "l'uptake" de guanine sur milieu MMG, la valeur de "l'uptake" est la moitié de celle observée pour les protoplastes (figure 31c).
Quand les cellules entières sont soumises au traitement complet utilisé pour l'obtention des protoplastes (les enzymes lytiques étant omis pendant les 90 minutes d'incubation), "l'uptake" de la guanine en milieu MMG est pratiquement nul. Nous ne pouvons expliquer ces résultats; cependant,nous prendrons comme contrôle pour "l'uptake" des cellules entières,les conditions d'expérience telles qu'elles sont décrites dans le cas de la figure 31c. (culture des cellules entières en YPGT, mesure de "l'uptake" en milieu MMG).

La figure 32 nous montre la représentation de Lineweaver et Burk pour "l'uptake" de guanine chez les protoplastes et les cellules entières. Nous observons que la valeur réduite de "l'uptake" par les protoplastes et les cellules,mesuré en milieu MMG,est associée à une djminution de Vmax plutôt qu'àunchangement dans la valeur du Km, si nous la comparons à la valeur de"l'uptake" des cellules entières en milieu MMA. (tableau VI).

Comme l'a montré Pourquié, chez les cellules entières de S. Pombé, "l'uptake" de guanine est dépendant d'une source d'énergie et est réduit en présence d'inhibiteurs compétitifs tels que l'adénine, l'hypoxanthine, et l'azaguanine (85). Comme le montre le tableau VII, lorsque le glucose est omis dans le mélange d'incubation, au moment de la mesure de "l'uptake" chez les protoplastes, cette dernière est réduite de 90 %. Il faut noter qu'en présence d'un poison d'énergie, tel que l'azide de sodium, nous n'observons pratiquement plus aucun "uptake" de guanine. L'inhibition par les analogues structuraux,naturels ou de synthèse,est du même ordre de grandeur chez les protoplastes et chez les cellules. L'optimum de pH de l' "uptake" de guanine pour les deux types d'organismes se situe entre pH 4,5 et 5.

FIGURE 33

EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR LA VITESSE INITIALE "D'UPTAKE" DE LA GUANINE CHEZ LES CELLULES ET LES PROTOPLASTES DE S. POMBE EN MILIEU MMG.



● : protoplastes. ○ : cellules entières.

-------: courbe de croissance de S. Pombe sur milieu YPGT.

La vitesse initiale de "l'uptake" de guanine dépend du stade de croissance auquel les cellules ont été récoltées, comme nous l'avons vu page 53. Cette variation de la vitesse initiale de "l'uptake" est indépendante de la composition du milieu de culture ; en effet, les levures cultivées en milieu MMA, en milieu YEA complet ou en milieu YPGT, donnent des résultats identiques (figure 33).

Cette dépendance de "l'uptake" de guanine vis à vis de la phase de croissance est conservée chez les protoplastes (figure 33).

On peut penser que la vitesse initiale relativement basse de "l'uptake" de guanine, observée chez les cellules entières dans les conditions indispensables à la bonne conservation des protoplastes, peut-être dûe, soit à une osmolarité trop forte, soit à une force ionique trop élevée du milieu MMG. Il est également possible que le choc subi par les cellules entières et les protoplastes, lors du passage du milieu de croissance YPGT au milieu de stabilisation protoplastique MMG, soit responsable de cette baisse de "l'uptake" : ainsi, la chute de "l'uptake", en milieu iso-osmotique, pourrait être dûe par exemple à l'absence totale d'ions métalliques divalents dans le milieu MMG alors qu'il s'en trouve dans le milieu de culture YPGT (91).

Cependant, les propriétés de ce système de transport de la guanine ne semblent pas fondamentalement modifiées par la transformation des cellules en protoplastes.

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AU NIVEAU DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE S. POMBE.

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il ne semblait pas y avoir d'élément du système de transport dans l'espace périplasmique et que les protoplastes se comportaient comme les cellules entières vis à vis de "l'uptake" de guanine. Nous pouvons en déduire que, si les phosphoribosyltransferases interviennent dans le processus de translocation des bases puriques, elles sont sans doute liées à la membrane plasmique elle-même.(86).

Rappelons que dans le chapitre II, nous avons vu les limites des différentes techniques, telles que la focalisation isoélectrique et l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, pour essayer de mettre en évidence deux formes actives de la GPRT,de poids moléculaire proche, qui pouvaient correspondre à deux localisations de l'enzyme dans la cellule.

La possibilité de doser l'activité PRT dans une fraction membranaire plasmique ,grâce à notre méthode d'obtention des protoplastes, pouvait constituer une nouvelle approche intéressante.
En plus du parallélisme entre les variations d'activité des PRTs et du transport des bases pendant la croissance, du comportement des mutants dépourvus d'activité PRT qui constituent autant d'arguments en faveur de l'intervention des phosphoribosyltransferases dans le phénomène de "l'uptake", la mise en évidence d'une activité APRT et GPRT au niveau de la membrane plasmique nous fournirait un autre argument en faveur de la participation de ces deux enzymes dans le mécanisme de "l'uptake".

En l'absence d'informations sur la liaison "enzyme-membrane", nous avons cru devoir prendre un certain nombre de précautions et chercher des méthodes peu brutales d'obtention des membranes plasmiques, dans l'éventualité d'une liaison fragile.

- Premier type d'expériences:

Si les phosphoribosyltransferases sont en grande quantité au niveau externe de la membrane cytoplasmique, il est envisageable de trouver une différence significative dans l'activité totale des PRTs exprimée par cellule en comparant le cytosol issu d'un protoplaste éclaté et l'extrait brut issu d'une cellule entière broyée. Ainsi, une culture de cellules de la souche sauvage sur milieu YPGT est arrêtée pendant la phase exponentielle au niveau du maximum d'activité des PRTs, c'est à dire à 10^7 cellules/ml dans nos conditions de culture. La moitié des cellules est transformée en protoplastes, qui subissent l'éclatement en milieu aqueux,et le surnageant contenant la fraction cytosoluble des PRTs est obtenu après 10 minutes de centrifugation à 10.000 tours/minute. L'autre moitié est broyée au broyeur Braun et subit une centrifugation à faible vitesse dont le surnageant constitue l'extrait brut.

Remarquons que nous avons tenu compte du décalage dans le stade de culture, entre les protoplastes et les cellules, dû au temps nécessaire pour la méthode de préparation protoplastique.

Dans les deux cas, nous avons effectué un comptage avant et après éclatement, ou avant et après broyage,afin de tenir compte des cellules non transformées en "protoplaste" ou non broyées.

Les résultats de ce type d'expérience sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	ACTIVITE SPECIFIQUE A-PRT PAR CELLULE	ACTIVITE SPECIFIQUE G-PRT PAR CELLULE
l. entières ⟶ Extrait brut	63,6 - 71,2.10^{-5} cpm/cell/min.	10,3 - 13,9.10^{-5} cpm/cell/min.
toplastes ⟶ cytosol	53,8 - 60,2	7,45 - 10,0
toplastes ⟶ membranes lavées	1,58 - 2,03	0,35 - 0,55

Il faut noter que les différences obtenues entre les activités spécifiques des PRTs issues du cytosol et celles issues de l'extrait brut, ne sont que très peu significatives ; en effet, le comptage des cellules d'une part et des protoplastes d'autre part est relativement peu précis et varie de 10 % environ d'une expérience à l'autre, (rappelons que tous nos comptages sont faits dans une chambre de Malassez).

- Deuxième type d'expériences.

Compte tenu de l'incertitude liée au comptage, nous avons cherché à mettre en évidence l'activité PRT directement au niveau des membranes. Il nous fallait donc d'abord obtenir une préparation membranaire de la façon la moins brutale possible,afin d'éviter le détachement de l'enzyme,et avoir,dans un deuxième temps,un contrôle valable nous permettant de savoir si cette préparation membranaire était ou non contaminée par une activité PRT cytoplasmique.

Le choc osmotique sur les protoplastes par l'eau ou un tampon de faible osmolarité les fait éclater immédiatement et s'avère trop violent. Les résultats obtenus par cette méthode étaient peu significatifs.
Nous avons donc décidé de"casser" les protoplastes dans un milieu isotonique en présence de billes de verre,comme nous l'avons décrit dans le chapitre "matériel et méthodes". Ce procédé a l'avantage de"pincer" le protoplaste entre deux billes, et de le vider ainsi de son cytoplasme en laissant une membrane plasmique peu abimée.

La glucose-6-phosphate deshydrogénase a été choisie comme marqueur cytosoluble : en effet, plusieurs auteurs, tels que Ryan et Kohlhaw, considèrent que cet enzyme n'a qu'une localisation cytoplasmique.

Les résultats obtenus par cette méthode de préparation des membranes plasmiques sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Rappelons que la"fraction membranaire lourde" correspond au culot obtenu après une centrifugation à 2.000 tours pendant 2 minutes de la suspension de protoplasteséclatés.

Cette fraction est constituée principalement de gros amas de membranes plasmiques, par observation au microscope en contraste de phase (Schwencke, communication personnelle).
" La fraction membranaire légère", correspond au culot obtenu après une centrifugation de 30... tours/minute pendant dix minutes sur le surnageant de la première centrifugation de la suspension des protoplastes éclatés. Elle est constituée principalement de petites vésicules membranaires et d'organites cellulaires tels que ribosome, mitochondries, fragments d'ergastoplasme.

	Act. spécif. G-PRT: % activité cytosoluble.	Act. spécif. A-PRT % activité cytosoluble.	Act. spécif. G-6-P DH % activité cytosoluble.
action membranaire lourde vée trois fois.	8,3	9,3	2,9
action membranaire légère vée trois fois.	0,8	0,6	0,3
ux de lavage : 3ème lavage	non mesurable	non mesurable	1,3

Notons que nous avons tenu compte de l'activité réductrice du NADP qui existe généralement au niveau des membranes, grâce au témoin de dosage de la G-6-P deshydrogénase.

Chaque fraction membranaire subit trois lavages. Le premier lavage enlève de la préparation environ 70 à 80 % d'activité PRT cytosoluble "contaminante" ; le deuxième lavage n'enlève plus que 10 à 20 % d'activité "contaminante" ; après le troisième lavage, les eaux de lavage ne comportent plus d'activité PRT mesurable. Par contre, elles présentent une faible activité G-6-P deshydrogénase (1,3 % de l'activité trouvée dans le cytoplasme), alors que nous avons trouvé une activité plus élevée au niveau de la fraction membranaire lourde, (3 %). Ceci pourrait signifier qu'au bout de 3 lavages, l'enzyme phosphoribosyltransferase subit une telle dilution qu'il perd en grande partie son activité.

Il semble très difficile techniquement de descendre en-dessous de 2 à 3 % d'activité contaminante des PRTs dans la fraction membranaire. En effet, si les lavages des membranes sont trop répétés ou trop violents, nous risquons de détacher une partie de l'enzyme lié à la structure membranaire. En se limitant à trois lavages indispensables, nous pouvons difficilement prétendre atteindre les résidus d'activité PRT cytoplasmique qui subsistent entre les amas de fragments des membranes accolées les unes aux autres.

Il n'en reste pas moins que nous trouvons 5 à 7 % d'activité GPRT et APRT dans les membranes en tenant compte de la contamination cytoplasmique. Il est difficile, à partir de cela, de conclure qu'il existe 5 % et 5 % seulement"d'activité PRT membranaire"; en effet, tous les résultats obtenus sont étroitement dépendants de la méthode de préparation des membranes.

Ainsi, Hochstadt-Ozer, bien que ne mesurant que 5 % d'activité APRT membranaire, postule,dans son modèle de transport de l'adénine,que tout l'enzyme est lié à la membrane.

Notons enfin que les expériences ci-dessus ont été faites sur des cellules de S. Pombe arrêtées au moment du maximum d'activité spécifique de leurs PRTs. Si nous faisons l'hypothèse que c'est seulement une partie du pool enzymatique cytosoluble qui migre vers la membrane,à un moment précis du stade de développement de la levure, il n'est pas évident que la phase de culture,à laquelle nous avons récolté nos cellules et dosé les activités PRTs dans les membranes,soit celle où effectivement la proportion de l'enzyme "membranaire" soit la plus importante.

Le fait que nous ne trouvions d'activité APRT et GPRT membranaire que dans"la fraction membranaire lourde", permet d'assurer qu'il ne s'agit pas d'une activité enzymatique liée aux mitochondries, à l'ergastoplasme, ou toutes autres structures qui ne sédimentent pas aux vitesses de centrifugation utilisées pour obtenir le culot de cette fraction. En définitive, ce faible pourcentage d'activité membranaire peut apparaître comme un argument positif en faveur de la participation des PRTs dans le processus de translocation des bases puriques,mais il est loin de constituer une preuve irréfutable.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons vu que l'éventualité de l'intervention des phosphoribosyltransférases, dans le phénomène de translocation, avait été suggérée par le fait que nos mutants affectés au niveau de ces enzymes avaient également une vitesse initiale d'entrée, des bases puriques correspondantes, fortement affectée.

Nous avons pu montrer que les variations d'activité spécifique des PRTs et de"l'uptake" d'adénine et de guanine, au cours du cycle de croissance de la levure, étaient concomitantes et passaient par un maximum au cours de la phase exponentielle.

Nous avons détecté un certain pourcentage d'activité APRT et GPRT dans"la fraction membranaire lourde."

D'autre part, la similarité des propriétés de"l'uptake" de guanine par les protoplastes de S. Pombe et par les cellules entières nous a permis de conclure qu'il n'existait probablement pas de facteur important du transport localisé dans l'espace périplasmique.

Un autre fait intéressant nous a été fourni grâce à l'étude du pool de PRPP où l'on observe que ce substrat des pyrophosphorylases voit sa concentration intra-cellulaire varier en fonction de la phase de croissance de la levure, et atteindre son maximum juste avant que les activités perméasiques et PRTs atteignent leur maximum d'activité respectif. Autrement dit, il semble que la chute du pool de PRPP, c'est à dire l'emploi de ce substrat par la cellule, corresponde à l'augmentation rapide des activités "d'uptake" et des PRTs. (il est possible également que la chute du pool de PRPP corresponde à une diminution de synthèse de ce substrat.)

Enfin, il est intéressant de noter que le mutant gup 1, affecté dans le transport des deux bases puriques, semble présenter in vitro une activité GPRT (et une activité APRT, à un moindre degré) sensible à un métabolite dialysable ; bien que nous n'ayons pas réussi à déterminer ce facteur responsable indirectement des désordres de"l'uptake".

Chez E. Coli, Hochstadt-Ozer a montré que la bactérie avait son "uptake" d'adénine stimulé par le PRPP et inhibé par les nucléotides, avec des valeurs de Km vis à vis de l'adénine et vis à vis du PRPP identiques à celles obtenues pour l'APRT, donc semblant soumis aux même régulations que l'adénine phosphoribosyltransferase. Ceci n'est pas le cas pour la levure Schizosaccharomyces Pombe, puisque nous avons vu que le PRPP ne stimule ni "l'uptake" d'adénine, ni celui de guanine, et que les inhibiteurs des PRTs n'inhibent pas "l'uptake" des bases puriques chez les cellules entières.

Ce même auteur, malgré seulement 5 % d'activité APRT mis en évidence au niveau des membranes, présume que la majorité sinon la totalité de l'enzyme est périplasmique et que l'APRT participe à un phénomène de translocation de l'adénine.

Il est tout à fait possible que, pour la levure comme pour la bactérie, les méthodes d'obtention des préparations membranaires entrainent un détachement important de l'enzyme en le rendant cytosoluble, et qu'une méthode plus douce puisse mettre en évidence plus de 5 à 7 % d'activité PRT associée à la membrane plasmique des deux organismes.

En définitive, la somme d'arguments directs et indirects, que nous avons mis en évidence au cours de ce travail, laisse prévoir l'existence de relations étroites entre le système de perméation et le système de transformation des bases en mononucléotides puriques ; mais il est impossible de conclure si les PRTs de S. Pombe participent réellement à un phénomène de translocation véritable de la base purique, ou si cette dernière n'est seulement prise en charge par les phosphoribosyltransferases qu'après avoir franchi la barrière cytoplasmique.

Nous n'avons pu répondre de façon claire, nette et précise à la question de savoir jusqu'à quel point les PRTs sont impliquées dans le processus de translocation des bases puriques. Chacune des approches que nous avons envisagées ne semblait pas pouvoir, à elle seule, résoudre notre problème.

Néanmoins, cette étude a eu l'avantage de nous familiariser avec une série de méthodes différentes qui ont permis d'aborder le problème de façons très diverses. De plus, les méthodes d'exploration mises au point dans cette thèse, notamment la possibilité d'obtention de protoplastes et de fractions membranaires de S. Pombe, peuvent ouvrir la voie à l'analyse directe de la relation entre les PRTs liées aux membranes et le transport des bases puriques. Ces nouvelles perspectives, bien que de longue haleine, donneront sans doute une meilleure réponse à la question.

B I B L I O G R A P H I E

1 - BUCHANAN, J.M. et HARTMAN, S.C.
Advan. Enzymology. 21, 99, 1959.

2 - KORNBERG, A. , LIEBERMANN, I. , SIMMS, E.S.
J.Biol.Chem. 215, 417, 1955.

3 - POURQUIE, J.
Thèse de Doctorat d'Etat, Orsay, 1972.

4 - MOAT, H. , FRIEDMAN, G.
Arch. Bioch. Biophys. 78, 146-156, 1958.

5 - REEM, G.H. , FRIEND, C.
Biochim. Biophys. Acta. 171, 58, 1969.

6 - MAGER, J. , MAGASANIK, B.
J. Biol. Chem. 235, 1374, 1960.

7 - MURRAY, A.W.
Biochem. J. 100, 671, 1966.

8 - BERLIN, R.D. , STADTMAN, E.R.
J.Biol. Chem. 241, 2679, 1966.

REMY C.N., SMITH, M.S.
J. Biol. Chem. 228, 325, 1957.

9 - KALLE, G.P. , GOTS, J.S.
Science, 142, 680, 1964.

10 - ADYE, J.C , GRI[illegible]
Biochim. Biophys. Acta. 118, 343, 1966.

11 - CHIGA, M. , ROGERS, A.E. , PLANT, G.W.E.
J. Biol. Chem. 236 , 1800, 1961.

12 - BERG, P. , JOKLIK, N.K.
J. Biol. Chem. 210, 757, 1954.

13 - WYNGAARDEN, J.B. , ASHTON, D.M.,
J. Biol. Chem. 234, 1492, 1959.

14 - CASKEY, C.T. , ASHTON, D.M. , WYNGAARDEN, J.B.
J. Biol. Chem. 239, 2570, 1964.

15 - NAGY, M. , REICHERT, U. , RIBET, A.M.
Biophys. Biochim. Acta. 370, 85, 1974.

HOCHSTADT-OZER, J. , STADTMAN, E.R.
J. Biol. Chem. 246, 17, 1971.

16 - ATKINSON, D.E. , FALL, L.
J. Biol. Chem. 242, 13, 1967.

17 - BORDEN, M. , NYHAN, W.L.,
Pediat. Research. 8, 1, 1974.

18 - SWITZER, R.L. , SOGIN, D.C.
J. Biol. Chem. 248, 3, 1973.

KLUNGSØYR, L. , ATKINSON, D.E.
Biochemistry. 7, 11, 1968.

19 - KABACK, H.R. ,
Biochim. Biophys. Acta. 265, 367-416, 1972.

HAROLD, F.M. ,
Bacteriol. Reviews. 36, 2, 1972.

20 - KUNDIG, W. , KUNDIG, F.D., ANDERSON, B. , ROSEMAN, S.
J. Biol. Chem. 241, 3243, 1966.

21 - SIMONI, R.D. , LEVENTHAL, M. , KUNDIG, W. , ROSEMAN, S.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1963, 1967.

22 - KUNDIG, W. , GHOSH, S. , ROSEMAN, S.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 1076, 1964.

22bis- KABACK, H.R. ,
J. Biol. Chem. 243, 3711, 1968.

23 - BERLIN, R.D. , STADTMAN, E.R.
J. Biol. Chem. 241, 2679, 1966.

24 - HOCHSTADT-OZER, J. , STADTMAN, E.R.
J.Biol. Chem. 246, 17, 1971.

25 - ZIMMERMAN, E.F. , MAGASANIK, B.
J. Biol. Chem. 239, 293, 1964.

27 - NEUHARD, J. , HOFFMEYER, J.
J. of Bacteriol. 106, 14, 1971.

28 - GRENSON, M.
Eur. J. Biochem. 11, 249, 1969.

29 - ROSENBLOOM, F.M. , HENDERSON, J.F. , SEEGMILLER, J.E.
Lancet. 2, 305, 1967.

30 - BERLIN, R.D., STADTMAN, E.R.
J. Biol. Chem. 241, 2679, 1966.

31 - NEUHARD, J. , HOFFMEYER, J.
J. of Bacteriol. 106, 14, 1971.

32 - ROBERTS, R.B. , ABELSON, R.M. , COWIE, D.B. , BRITTON, R.J.
Carnegie Inst. Wash. publ. 607, 303, 1955.

33 HOCHSTADT,-OZER, J.
Ind. Proc. 30, 1068, 1971

34 - ZIMMERMAN, E.F., MAGASANIK, B. ,
J. Biol. Chem. 239, 293, 1964.

35 - ADYE, J.C. , GOTS, J.S.
Biochim. Biophys. Acta. 118, 343, 1966.

36 - HOCHSTADT-OZER, J. , STADTMAN, E.R.
J. Biol. Chem. 246, 17, 1971.

37 - BAGNARA, A.S., FICH, L.R.
Eur. J. Biochem. 36, 422, 1973.

38 - POURQUIE J.
Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Orsay, 1972.

39 - SVIHLA, G. , SCHLENK, F. , DAINKO, J.L.
J. of Bacteriol. 82, 808, 1961.

40 - LOWRY, O.H. , RANDALL, R.J.
J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.

41 - FLAKS, J.G.
Methods in enzymology. 4, 158, 1963. Acad. press. N.Y.

42 - DOMAGK, G.F. , CHILLA, R. , SORENSEN, N.
Z. physiol. Chem. 350, 626, 1969.

43 - MITCHISON, J.M. , GROSS, P.R.
Exp. Cell. Research. 37, 259, 1965.

44 - NAGY, M.
Communication personnelle.

45 - FLAKS, J.G. , BUCHANAN, J.M.
J. Biol. Chem. 228, 201, 1957.

HOCHSTADT-OZER, J. , STADTMAN, E.R.
J. Biol. Chem. 246, 17, 1971.

46 - de GROODT, A. ,
Thèse, Université libre de Bruxelles, 1969.

de GROODT, A. , HESLOT, H. , NAGY, M.
C.R.A.S. Paris. 269, 1431, 1969.

de GROODT, A. , WHITEHEAD, E.P., HESLOT, H.
Biochem. J. 122, 415, 1971.

47 - SCHWENKE, J. , MAGANA-SCHWENKE, N.
Biochim. Biophys. Acta. 173, 302, 1969.

48 - GRENSON, M. , HOU, C. , CRABEEL, M.
J. Bacteriol. 103, 770, 1970.

49 - ROTH, D.G. , DEUEL, T.F.
J. Biol. Chem. 249, 297, 1974.

50 - FLAKS, J.G. ,
Methods in enzymology. 4, 158, 1963. Acad. Press. N.Y.

51 - SWITZER, R.L.
J. Biol. Chem. 244, 2854, 1969.

52 - ASHIHARA, H.
Plant. Sci. lett. 2, 119, 1974.

53 - HENDERSON, J.F., KHOO, K.Y.
J. Biol. Chem. 240, 2358, 1965.

54 - HERSCHKO, A. , MAGER, J.
Biochim. Biophys. Acta. 184, 64, 1969.

55 - SWITZER, R.L.
J. Biol. Chem. 244, 2854, 1969.

56 - SWITZER, R.L. , SOGIN, D.C.
J. Biol. Chem. 248, 1063, 1973.

57 - SWITZER, R.L.
J. Biol. Chem. 244, 2854, 1969.

58 - ROTH, D.G. , SHELTON, E.
J. Biol. Chem. 249, 291, 1974.

59 - ATKINSON, D.E. , FALL, L.
J. Biol. Chem. 242, 13, 1967.

60 - HERSCHKO, A. , MAGER, J.
BIochim. Biophys. Acta. 184, 64, 1969.

61 - SWITZER, R.L. , SOGIN, D.C.
J. Biol. Chem. 248, 1063, 1973.

63 WINTER, M.
Thèse, Université Libre de Berlin. 1972.

64 - FUKUHARA, H.
Biochim. Biophys. Acta. 134, 143, 1967.

65 - MATILE, P.
Proceedings of the 2nd Symposium on heasts, Bratislava, p. 503, 1969.

66 - HOUSSET P., NAGY, M. , SCHWENCKE, J.
J. Gen. Microbiol. 90, , 1975.

67 - PRINGLE, J.R. ,
Methods in cell. Biology. Vol. 9, 1974. Acad. Press. N.Y.

68 - HOUSSET, P. , NAGY, M.
Proceedings of the fourth International Symposium on Yeasts. Vienne
p. 289, 1974.

69 - PRINGLE, J.R.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 46, 1970.

70 - MATILE, P. , WIEMKEN, A.
Arch. Mikrob. 56, 148, 1967.

72 - SERRANO , GANCEDO, C.
Eur. J. Biochem. 34, 479, 1973.

73 - BORDEN, M. , NYHAN, W.L.
Pediat. Research. 8, 1, 1974.

74 - HOLMES, E.W. , KELLEY, W.N.
J. Biol. Chem. 248, 6035, 1973.

75 - GREEN, C.D. , MARTIN, D.W.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3698, 1973.

76 - LALANNE, M. , HENDERSON, J.F.
Anal. Biochem. 62, 131, 1974.

77 - BAGNARA, A.S. , FINCH, L.R.
Anal. Biochem. 54, 535, 1973.

78 - BAGNARA, A.S. , FINCH, L.R.
Eur. J. Biochem. 41, 421, 1974.

79 - de GROODT, A.
Thèse Université Libre de Bruxelles. 1969.

80 - NAGY, M.
Biochim. Biophys. Acta. 198, 471, 1970.

81 - BECKER, M.A. , SEEGMILLER, J.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2749, 1973.

82 - GREEN, C.D., MARTIN, D.W.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3698, 1973.

83 - GREENE, L. , BOYLE, A.J. , SEEGMILLER, J.E.
Science. 167, 888, 1970.

84 - [illegible]
J. Biol. Chem. 248, 6035, 1973.

85 - POURQUIE, J.
Biochim. Biophys. Acta. 209, 269, 1970.

86 - HEPPEL, L.A.
Structure and function of Biological membranes. Acad. Press. N.Y. 1971. p. 224

87 - HORI, M. , UMEZAWA, H.
J. Antibiotics (Tokyo) A17, 96, 1964.

88 - HENDERSON, J.F. , PATERSON, A.R.P. , CALDWELL, I.C. , HORI, M.
Cancer Research, 27, 715, 1967.

89 - FLEET, G.H. , PHAFF, H.J.
Mould and plant protoplasts, p. 33, Acad. Press. N.Y., 1973.

90 - BUSH, D.A. , HORISBERGER, M. , HORMAN, I. , WURSCH, P.
J. gen. microbiol. 81, 199, 1974.

91 - GHEI O.K. and KAY W.W.
Biochim. Biophys. Acta. 401, 440, 1975.